

果樹および果実における内生アブシシン酸制御と
環境ストレス応答に関する研究

2021年1月 提出

千葉大学大学院園芸学研究科
環境園芸学専攻生物資源科学コース

富山 博之

(千葉大学審査学位論文)

果樹および果実における内生アブシシン酸制御と
環境ストレス応答に関する研究

2021年1月 提出

千葉大学大学院園芸学研究科
環境園芸学専攻生物資源科学コース

富山 博之

目次

第1章 序論.....	3
1.1 環境ストレス.....	3
1.2 アブシシン酸 (ABA)	5
1.3 内生 ABA 制御化合物.....	10
1.4 研究の目的と論文の構成.....	12
第2章 ABA8'位水酸化酵素阻害剤処理がブドウ挿し木の乾燥ストレス耐性 および発根に及ぼす影響.....	13
2.1 緒言.....	13
2.2 材料および方法.....	16
2.3 結果.....	23
2.4 考察.....	33
2.5 結論.....	36
第3章 収穫後の高温ストレス処理+ABA 合成阻害剤処理がウメ果実の追熟に 及ぼす影響.....	38
3.1 緒言.....	38
3.2 材料および方法.....	40
3.3 結果.....	47
3.4 考察.....	56
3.5 結論.....	58

第4章 総括.....	60
4.1 本論文の摘要.....	60
4.2 今後の課題および展望.....	61
引用文献.....	64
謝辞.....	78

第1章 序論

1.1 環境ストレス

植物にとって好ましくない外的要因には病虫害、雑草などによる生物的ストレスと高・低温や乾燥などの非生物的ストレス (Fig. 1.1) があり、後者は環境ストレスと呼ばれる。作物生産において、環境ストレスによる収量減少への影響は生物的ストレスよりも大きいと推定されている (Ashraf et al., 2012)。現在、世界人口の増加による食料需要の増大や気候変動に起因する食糧生産の不安定化が懸念されており、気候変動による乾燥や高温、低温、降雨などの環境ストレス下での安定した農作物生産が求められている (Nishimura et al., 2019)。特に、気候変動による乾燥ストレスが世界中で増加している (Ullah et al., 2018)。乾燥ストレスは植物の成長を最も制限する環境ストレスであると認識されており (Lambers et al., 2008)、乾燥ストレス耐性品種や乾燥ストレス耐性付与技術への期待が高まっている。一方で、適度な環境ストレス処理は収穫後の貯蔵性や品質維持に好ましい影響を及ぼす (Opio et al., 2017; Francini and Sebastiani, 2019)。中でも温水処理や温風処理、蒸気処理などの高温ストレス処理は果実の病虫害防除効果に加え、クライマクテリック型果実の日持ち性向上効果を示す (Lurie, 1998)。一般的に、クライマクテリック型果実の日持ち性向上には、エチレン作用阻害剤である 1-メチルシクロプロペン (1-MCP) 処理が効果的であり、SmartFresh という商品名でリンゴやカキなどで実用化されている。しかし、モモやウメなど果実の種類によっては 1-MCP によるエチレン生成の抑制効果は低いことが報告されており (Hayama et al., 2005; Poyesh et al., 2017)、効果的な日持ち性向上技術の開発が求められている。特に、高温ストレス処理は安全かつ効果的な追熟抑制法として認識されており、果実のポストハーベスト処理として期待されている (Paull and Chen, 2000)。

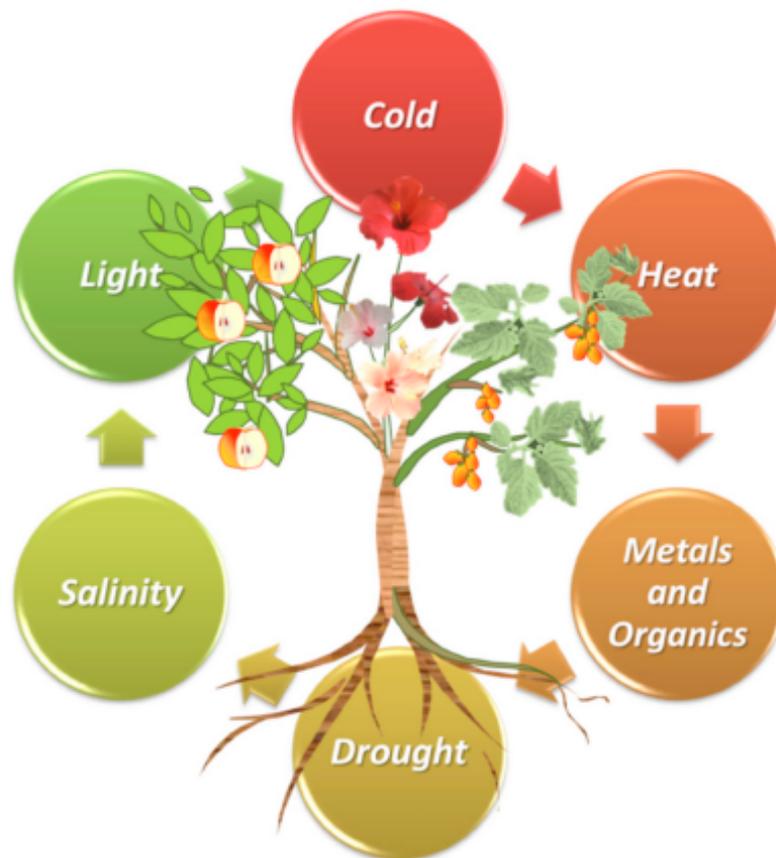


Fig. 1.1 Potential abiotic stresses that can compromise crop yield and produce quality (Francini and Sebastiani, 2019).

1.2 アブシシン酸 (ABA)

アブシシン酸 (ABA) は植物の休眠や成熟、環境ストレス耐性に関与している植物ホルモンとして知られている。環境ストレスにより合成された ABA は細胞に作用することで細胞内シグナル伝達系を活性化し、ABA 応答性遺伝子発現を誘導する。ストレスから開放された場合、ABA は速やかに分解され、ABA による応答はキャンセルされる。したがって、内生 ABA 量の調節が環境ストレス応答の制御に重要である。一般的に、内生 ABA 量は ABA の合成と不活性化のバランスにより決定している (Kushiro et al., 2004)。高等植物において、ABA は C40 カロテノイド類を初発材料に合成される (Fig. 1.2)。キサントキシンまでの反応は葉緑体で行われ、それ以降の反応は細胞質基質で進行する。9-*cis*-エポキシカロテノイド類である 9-*cis*-ビオラキサンチンおよび 9'-*cis*-ネオキササンチンからキサントキシンを切り出す 9-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ (NCED) による酸化開裂反応が ABA 合成の律速段階とされる。一方で ABA の代謝は、水酸化による環構造の修飾あるいは糖の結合による結合型 ABA の形成の 2 種類に分類される。糖による結合体形成は可逆的反応であるのに対し、水酸化による環構造の修飾は不可逆的反応であることから、水酸化による代謝が ABA 不活性化の主要経路であると考えられている。ABA の水酸化は 7'位、8'位および 9'位の 3 ヶ所で行われるが、8'位の水酸化が最も重要である (Okamoto et al., 2011)。8'位の水酸化により ABA は 8'-ヒドロキシ ABA、ファゼイン酸 (PA) を経てジヒドロファゼイン酸 (DPA) へと代謝され、完全に不活性化する (Fig. 1.3)。8'位の水酸化に関与している ABA 8'位水酸化酵素はシトクローム P450 酵素 CYP707A サブファミリーであることがシロイヌナズナを用いた研究から解明された (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004)。ABA の生理活性を発揮するには、細胞が ABA を認識し、その情報を作用点に伝える必要がある。ABA の応答は気孔閉鎖のように遺伝子発現の変化を必要としない応答と遺伝子発現変化を

必要とする応答があるが、ABA 受容体 PYR/PYL/RCARs はそのどちらの応答にも必要である。細胞中の内生 ABA 量が少ない場合、タンパク質脱リン酸化酵素 Protein phosphatase 2Cs (PP2Cs) がタンパク質リン酸化酵素 SNF1-related protein kinase 2s (SnRK2s) による ABA 情報伝達を抑制しているが、内生 ABA 量が多い場合、ABA を認識した PYR/PYL/RCARs が PP2Cs を不活性化することで、SnRK2s が活性化し、ABA 応答遺伝子の発現を誘導する (Fig. 1.4)。

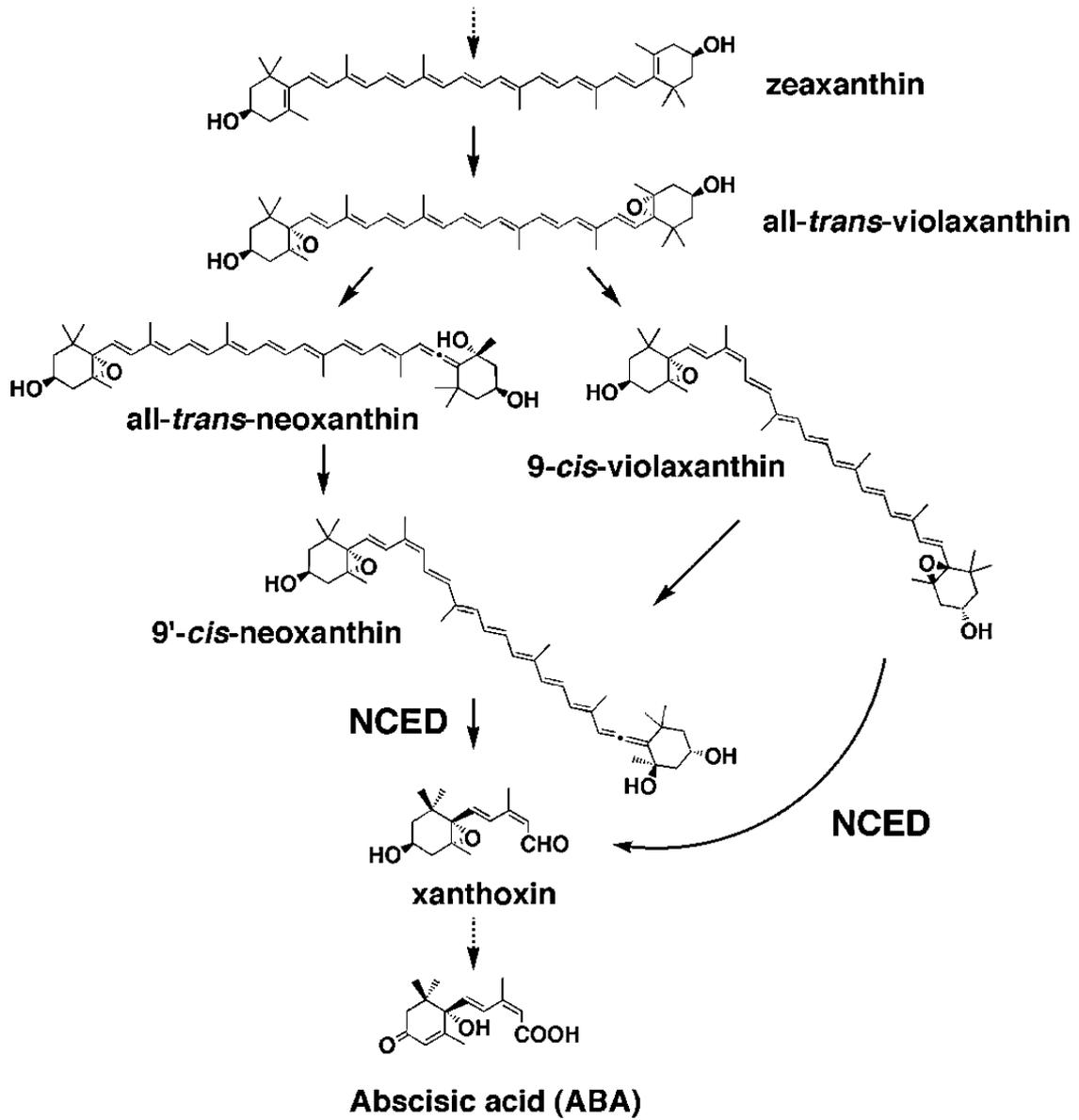


Fig. 1.2 The pathway of ABA biosynthesis (Han et al., 2004).

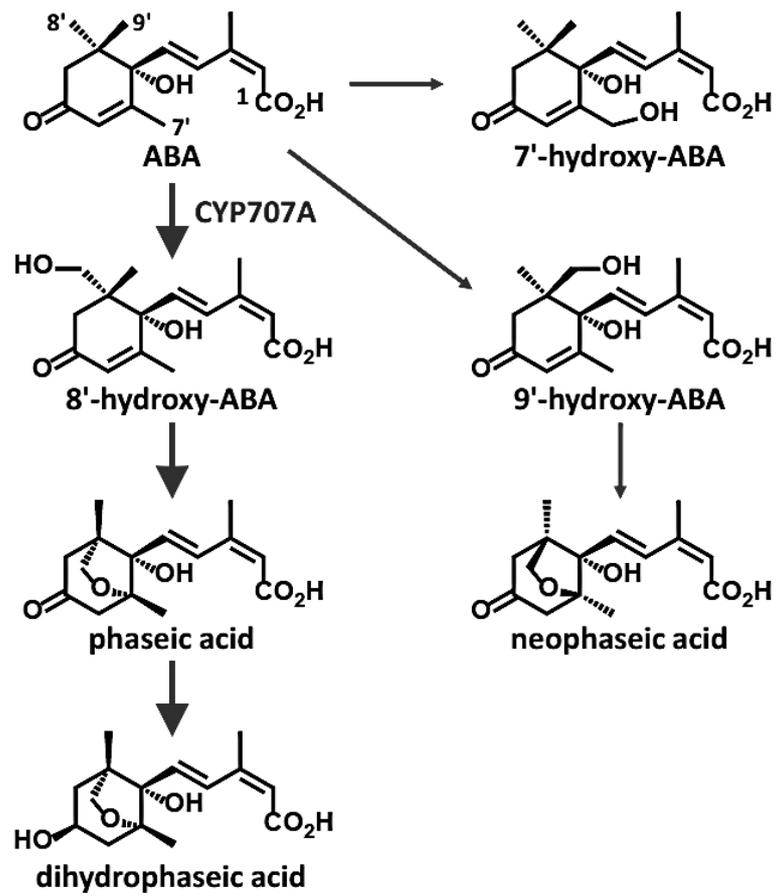


Fig. 1.3 The pathway of ABA hydroxylation (modified from Todoroki, 2016).

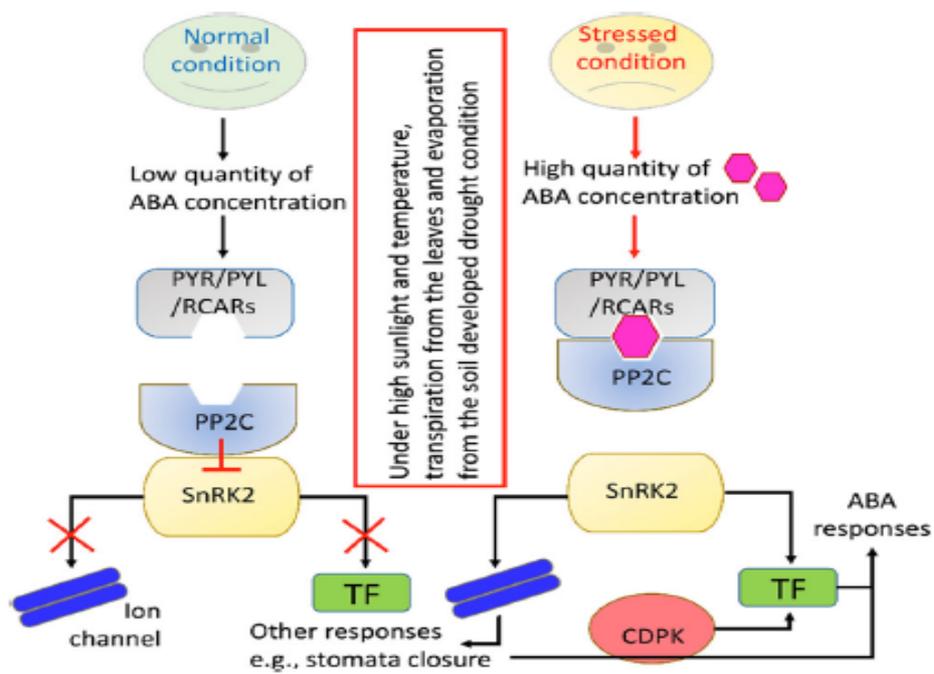
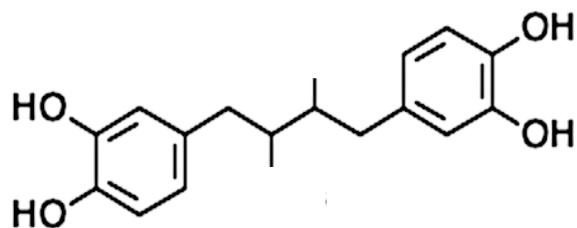


Fig. 1.4 Signaling pathway of ABA during stress conditions (modified from Ullah et al., 2018).

1.3 内生 ABA 制御化合物

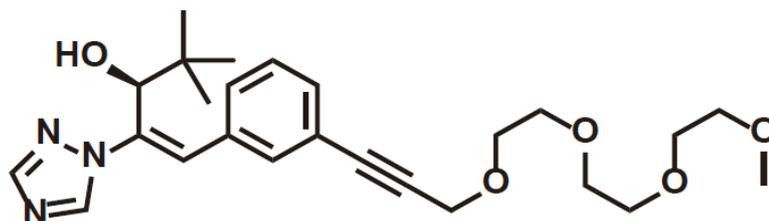
既述のように、ABA の合成および不活性化に関与する鍵酵素が明らかとなったことで、これら主要酵素をターゲットにした化合物が見出された (Fig. 1.5)。ノルジヒドログアイアレチン酸 (NDGA) は NCED の働きを阻害することから、ABA 合成阻害剤として研究されている (Creelman et al., 1992)。例えば、非クライマクテリック型果実であるブドウの成熟には ABA が関与しており、果房への NDGA 処理がブドウ果実の内生 ABA 量を抑制することで成熟を遅延させることが報告されている (Jia et al., 2017; Lin et al., 2018)。また、内生 ABA 量の増強を目的に、*ent*-カウレン酸化酵素 CYP701A 阻害剤ウニコナゾールの構造を基に ABA8'位水酸化酵素 CYP707A を特異的に阻害するアブシナゾール (Abz) が開発された (Todoroki et al., 2009a,b, 2010; Okazaki et al., 2011, 2012)。我々の研究室では Abz の一種である Abz-E2B を乾燥ストレスに曝される前のリンゴ実生に葉面散布した結果、*MdCYP707As* 遺伝子発現の抑制に伴ない葉中の内生 ABA 濃度が増加し、リンゴ実生の乾燥ストレス耐性を向上させることを確認した (Kondo et al., 2012)。近年、Abz-E2B よりも CYP707A の阻害活性が高く、かつ合成収率の高い化合物として Abz-E3M が開発された (Takeuchi et al., 2016)。

(a)



Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)

(b)



Abscinazole-E3M (Abz-E3M)

Fig. 1.5 Chemical structures of (a) nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and (b) abscinazole-E3M (Abz-E3M).

1.4 研究の目的と論文の構成

以上より、内生 ABA の合成と不活性化を自由自在に制御することで、環境ストレスに対する植物の応答をより好ましい応答へと制御できるのではないかと仮説を立て、本研究では植物の ABA 内生量の調節が環境ストレス応答に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、乾燥ストレス下における内生 ABA 量の増強および高温ストレス下における内生 ABA 量の抑制について試みた。まずは第 2 章において「ABA8'位水酸化酵素阻害剤処理がブドウ挿し木の乾燥ストレス耐性および発根に及ぼす影響」について検討し、次に第 3 章において「収穫後の高温ストレス処理+ABA 合成阻害剤処理がウメ果実の追熟に及ぼす影響」について検討した。第 4 章では総括として第 2 章および第 3 章の結果から研究のまとめと今後の課題および展望について記した。

第2章 ABA8'位水酸化酵素阻害剤処理がブドウ挿し木の

乾燥ストレス耐性および発根に及ぼす影響

2.1 緒言

植物はライフサイクルの中で様々な環境ストレスに曝されている。特に乾燥ストレスは作物生産を制限する重要な環境要因である。植物は乾燥ストレスを回避するための仕組みを有している。中でも植物ホルモンの合成は乾燥ストレス耐性に密接に関係していると考えられている。例えば、植物組織におけるアブシシン酸 (ABA) の蓄積は乾燥ストレスに対する初期反応の一つである (Mahouachi et al., 2012; Zhang and Huang, 2013; Kowitcharoen et al., 2015)。蓄積した ABA は乾燥ストレス耐性を高めるために、気孔閉鎖および ABA 応答性遺伝子の発現を誘導することが知られている (Nambara and Marion-Poll, 2005; Jitratham et al., 2006; Kowitcharoen et al., 2015)。植物組織中の内生 ABA 濃度は ABA の合成と不活性化のバランスにより決定している (Kushiro et al., 2004)。ABA の不活性化は主に ABA の水酸化によるもので、特に ABA8'位水酸化酵素 (CYP707A) による 8'位の水酸化が ABA 不活性化の主要経路とされている。一方で、9-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ (NCED) は ABA 合成の律速酵素として知られている (Nambara and Marion-Poll, 2005)。Kondo ら (2012) は乾燥ストレス下におけるリンゴ実生への ABA8'位水酸化酵素阻害剤処理が *MdCYP707As* の発現を抑制し、*MdNCEDs* の発現を高めることで、リンゴ葉中の内生 ABA 濃度が増加し、乾燥ストレス耐性が向上することを報告した。また、Sales ら (2017) はリンゴ実生において、ABA8'位水酸化酵素阻害剤処理が塩ストレス耐性を向上させることを示した。このように植物体への ABA8'位水酸化酵素阻害は乾燥や塩ストレスに対する耐性を高めることが報告されている。さらに乾燥ストレスは活性酸素種 (ROS) を形成し、植物の細胞膜を破壊する (Cruz

de Carvalho, 2008)。しかし、植物は細胞への適合溶質の蓄積などによる浸透圧調節をすることで、乾燥ストレスから身を守る。特に、プロリンは水ストレスに最も関係した適合溶質である (Yoshida et al., 1997)。

挿し木はブドウ (*Vitis* spp.) を含む果樹の繁殖法の一つとして利用されている。不定根の発根はブドウの挿し木繁殖の成否を決定する重要な形態形成である (Shiozaki et al., 2013)。インドール-3-酢酸 (IAA) やインドール-3-酪酸 (IBA) などのオーキシンは発根を誘導することが知られており、Kawai (1996) の報告によれば、ブドウの挿し木発根には IAA が関連していることが報告されている。IAA あるいは IBA の外生処理は挿し穂中の内生オーキシンおよび結合型オーキシンの濃度を変化させることで、発根に影響を及ぼすことが示されている (Nordstrom et al., 1991; Štefančíč et al., 2007)。例として、IBA の葉面散布はキク、レンギョウおよびウォールジャーマンダーの挿し木発根を促進した (Blythe et al., 2003; Taylor and Hoover, 2018)。また、ペチュニアやアボカドの挿し木において、オーキシン極性輸送阻害剤であるナフチルフタラミン酸 (NPA) やトリヨード安息香酸 (TIBA) の葉面散布が挿し穂基部中の内生 IAA 含量を減少させることで、不定根の発根を抑制したことが報告されている (García-Gómez et al., 1994; Ahkami et al., 2013)。

オーキシンによる植物の成長や発達の制御はオーキシンのシグナル伝達関連遺伝子の発現を変化させることで行われる。植物のオーキシン反応において、転写因子である Auxin response factors (ARFs) と転写抑制因子である Auxin/IAAs (Aux/IAAs) の相互作用が重要な役割を担っている (Ulmasov et al., 1999; Tiwari et al., 2001)。細胞内のオーキシン濃度が低い場合、Aux/IAAs は転写補助抑制因子 TOPLESS および ARFs と結合し、ARFs を不活性化する。一方で、オーキシン濃度が高い場合、ユビキチンリガーゼ複合体 SCF^{TIR1/AFB} が Aux/IAAs と結合することで、Aux/IAAs を分解する。その結果、開放された ARFs が活性化し、オ

ーキシン反応関連遺伝子の発現を誘導する (Szemenyei et al., 2008; Wang and Estelle, 2014)。これまでに、シロイヌナズナの遺伝子欠損変異体やメディアイチイのトランスクリプトーム解析から ARFs の発根への関与が調査されてきた (Wilmoth et al., 2005; Ren et al., 2019)。シロイヌナズナにおいて、*ARF17* の過剰発現株の不定根発根は野生株に比べ抑制され、逆に *ARF6* および *ARF8* は不定根発根を促進させた (Gutierrez et al., 2009)。

ブドウは比較的乾燥に耐性のある樹種とされる (Schultz, 2003) が、挿し木繁殖において、発根前の挿し穂は土壤中の水分を十分に吸水することができないことから地上部が乾燥に弱く、最悪の場合、枯死してしまう。そこで本章では、Takeuchi ら (2016) により開発された ABA8'位水酸化酵素阻害剤アブシナゾール E3M (Abz-E3M) を供試し、乾燥ストレス下でのブドウ挿し木における Abz-E3M 処理が挿し穂の乾燥ストレス耐性および不定根発根に及ぼす影響について検討した。

2.2 材料および方法

2.2.1 供試材料

供試材料として、本研究科研究圃場栽植のブドウ‘巨峰’ (*Vitis vinifera* L.×*Vitis labrusca* L.) 成木 1 樹から採取した 1 年生枝を供試した。2018 年の冬季剪定時に‘巨峰’の 1 年生枝を採取し、乾燥を防ぐためにビニールで完全に被覆後、0°Cの冷蔵庫中で保管した。挿し穂は 2 節（長さ約 15–18 cm）に調製し、下位節の芽は摘除した。調製後、挿し穂基部を一晩水に浸漬させた。挿し床として pH を 5.0–6.0 に調整したピートモスを充填した育苗箱（52 cm×26 cm×6 cm）1 箱あたり挿し穂 90 本となるように挿し木を行った。前述の育苗箱は計 6 箱準備し、温室内で育成した。

2.2.2 Abz-E3M 処理および乾燥ストレス処理

全体の 90%にあたる挿し穂において、第 1 葉が完全に展開した挿し木 22 日後に Abz-E3M 処理および乾燥ストレス処理を行った。Abz-E3M の処理濃度は、リンゴ実生を供試した試験（Kondo et al., 2012）と同様に 100 μ M に設定した。挿し穂 1 本あたり 100 μ M Abz-E3M 溶液 2 mL となるように霧吹きを用いて葉面散布した。無処理区は蒸留水のみを挿し穂 1 本あたり 2 mL となるように葉面散布した。Abz-E3M 処理から 8 日間は無灌水とすることで乾燥ストレス処理とした。また、乾燥ストレス処理 8 日後に再灌水を行った。

2.2.3 サンプルングおよび発根率の調査

サンプルングは Abz-E3M および乾燥ストレス処理 0、1、4、8 および 11 日後に行い、いずれの日も晴天であった。一度のサンプルングで育苗箱 1 箱あたり挿し穂 18 本をランダムに採取し、処理区あたり育苗箱 3 箱からサンプルングすることで 3 反復とした。すなわち一度のサンプルングで挿し穂 54 本を採取した。

挿し穂基部において、長さ 5 mm 以上の根が確認された場合を発根ありとし、発根率を算出した。発根率の調査後、葉および挿し穂基部約 1 cm をそれぞれ液体窒素で凍結させ、分析まで -80°C の冷凍庫中で保存した。

2.2.4 水ポテンシャルの測定

水ポテンシャルの測定には WP-4T potential meter (Decagon Devices Inc.) を用いた。日の出前 (午前 3 時から午前 4 時までの間) に育苗箱 1 箱あたりランダムに選んだ挿し穂 2 本の第 1 葉を採取した。すなわち 1 処理区あたり育苗箱 3 箱から計 6 枚採取した。採取した葉は、表面に蒸留水 100 μL を垂らした後、サンドペーパーを用いて表面のクチクラを取り除き、速やかにキムタオルを用いて水分を完全に拭き取った。その後、付属のカップにサンプルを入れ、水ポテンシャルを測定した。

2.2.5 気孔コンダクタンスの測定

気孔コンダクタンスの測定には Leaf Porometer SC-1 (Decagon Devices Inc.) を用いた。サンプリング日の午前 9 時から午前 10 時までの間に育苗箱 1 箱あたりランダムに選んだ挿し穂 4 本の第 1 葉の気孔コンダクタンスを測定した。1 処理区あたり育苗箱 3 箱から計 12 枚を測定した。

2.2.6 プロリン濃度の測定

プロリン濃度の測定は Bates ら (1973) の方法を参考に行った。凍結保存した葉 0.5 g を 3% (w/v) スルホサリチル酸 10 mL 中でホモジナイザー (PHYSCOTRON NS-52, Microtec Co., Ltd.) を用いて粉砕した。微量高速遠心機 (CF15RN, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd.) で遠心分離 (15000 g, 10 分, 4°C) した後、上清 2 mL に 2 mL の氷酢酸および 2 mL の Acid-ninhydrin 溶液 (1.25 g ニンヒドリン, 30 mL

氷酢酸および 20 mL 6 M リン酸の混合溶液) を加え、100°C 下で 1 時間反応させた。その後、氷中で十分に冷やすことで反応を停止させた。反応液に 4 mL のトルエンを加え激しく混合した後、トルエン層の波長 520 nm における吸光度を分光光度計 (U-2910, Hitachi Ltd.) を用いて測定した。プロリン濃度はプロリンから作成した標準曲線を用いて決定した。

2.2.7 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性は Kowitcharoen ら (2018) の方法に従った。すなわち、凍結保存した葉 0.3 g を 80% (v/v) エタノール 25 mL 中でホモジナイザー (PHYSCOTRON NS-52, Microtec Co., Ltd.) を用いて粉碎した。微量高速遠心機 (CF15RN, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd.) で遠心分離 (15000 g, 10 分, 4°C) した後、上清 20 μ L と 0.1 mM DPPH 溶液 980 μ L を混合した。混合溶液を室温、暗黒下で 20 分間静置した後、波長 516 nm における吸光度を分光光度計 (U-2910, Hitachi Ltd.) を用いて測定した。最終的な DPPH ラジカル消去活性はトロロックス (TE) から作成した標準曲線から決定し、TE 等量で表した。

2.2.8 内生 ABA、PA、DPA および IAA の抽出・分析

ABA および IAA の抽出は Kondo ら (2014) および Kamboj ら (1999) の方法を参考に行った。0.5 g の凍結サンプルに内部標準としてそれぞれ 0.2 μ g の [$^2\text{H}_6$]-ABA、[$^2\text{H}_3$]-PA、[$^2\text{H}_3$]-DPA および [$^2\text{H}_5$]-IAA を加え、0.1% (w/v) ジブチルヒドロキシトルエンおよび 0.1% (w/v) L(+)-アスコルビン酸含有の 80% (v/v) メタノール 10 mL とともに氷中でホモジナイザー (PHYSCOTRON NS-52, Microtec Co., Ltd.) を用いて粉碎した。氷中、暗黒下で 1 時間振盪させた後、微量高速遠心機 (CF15RN, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd.) で遠心分離 (15000 g, 15 分, 4°C) し、上清を濾過した。濾液はロータリーエバポレーターを用いて乾固し

た。20 mL の蒸留水で溶解後、溶液の pH が 2.5 となるように 1M 塩酸を加えた。その後、20 mL の酢酸エチルとともに分液ロート中で分離させ、酢酸エチル層を回収した。酢酸エチルによる分配は 3 回行い、回収した酢酸エチル層はロータリーエバポレーターで乾固した。20 mM 酢酸含有の 25% (v/v) アセトニトリル溶液 1.5 mL で再溶解した後、孔径 0.45 μm の Omnipore 親水性 PTFE メンブレンフィルター (Merck Millipore Corp.) で濾過した。その後、濾液 500 μL を高速液体クロマトグラフィー (HPLC, GULLIVER, JASCO Corp.) を用いて精製した。検出器には UV 検出器 (JASCO UV-975, JASCO Corp.) を、カラムには ODS-Mightysil RP-18GP カラム ($\phi 5 \mu\text{m}$, 150 mm \times 10 mm, Kanto Chemical Co., Inc.) を用い、カラムオーブンは 40 $^{\circ}\text{C}$ 、流速は 1.3 mL/分に設定した。移動相には 20 mM 酢酸含有の 25% (v/v) アセトニトリル (A 液) と 20 mM 酢酸含有の 50% (v/v) アセトニトリル (B 液) を用い、以下のグラジエント条件で精製を行った。0 分 (98% : A, 2% : B)、30 分 (2% : A, 98% : B)、45 分 (98% : A, 2% : B)。検出波長は 254 nm とした。HPLC により ABA、 $[\text{H}_6]$ -ABA、PA、 $[\text{H}_3]$ -PA、DPA、 $[\text{H}_3]$ -DPA、IAA および $[\text{H}_5]$ -IAA の各画分を採取後、ロータリーエバポレーターを用いて乾固した。分析試料のメチル化のために、メタノール:ジエチルエーテル (1:9, v/v) 溶液 1 mL で再溶解後、溶液の色が黄色く変化するまでジアゾメタンガス含有のジエチルエーテルを加えた。暗黒下で 10 分間静置後、窒素ガスを吹き付けながら 37 $^{\circ}\text{C}$ 下で乾固した。100%メタノール 30 μL で溶解後、1 μL をガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS, QP5000, Shimadzu Corp.) で分析した。分析はイオンモニタリング (SIM) で行い、カラムには InertCap 1MS カラム (30 m \times 0.25 mm, GL Sciences Inc.) を用いた。カラム温度は以下のグラジエント条件で行った。分析開始後 2 分間は 60 $^{\circ}\text{C}$ 、その後 270 $^{\circ}\text{C}$ まで 10 $^{\circ}\text{C}$ /分で温度を上げ、最終的に 270 $^{\circ}\text{C}$ を 35 分間保持した。キャリアガスにはヘリウムを用い、流速は 1.3 mL/分とした。各成分濃度は各 m/z (ABA : 190, $[\text{H}_6]$ -ABA : 194, PA : 276, $[\text{H}_3]$ -PA :

279, DPA : 278, [³H₃]-DPA : 281, IAA : 130, [³H₃]-IAA : 135) におけるピーク面積から面積比を算出後、それぞれの濃度を標準曲線から決定した。

2.2.9 総 RNA 抽出および cDNA 合成

総 RNA 抽出は Li ら (2008) および Henderson and Hammond (2013) の臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) 法を参考に行った。抽出液として 15 mL の 5 M 酢酸カリウム、500 μL の β-メルカプトエタノールおよび 35 mL の CTAB バッファー (2% CTAB, 2%ポリビニルピロリドン-40, 2 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)) の混合溶液を作成し、65°C下で温めた。-80°Cの冷凍庫中で凍結保存した挿し穂基部 0.5 g を液体窒素中で乳鉢、乳棒を用いて粉碎し、粉末を 8 mL の抽出液に加えて、65°C下で 8 分間温めた。微量高速遠心機 (CF15RN, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd.) で遠心分離 (10000 g, 5 分, 室温) した後、上清のみを等量のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1, v/v) 溶液と十分に混合し、遠心分離 (10000 g, 10 分, 室温) 後、上層のみを回収した。上層に対して 0.04 倍量の 3 M 酢酸カリウム溶液および 0.7 倍量のイソプロパノールを加え、転倒混和した。その後、MicroElute Clean-Up カラム (Favorgen Biotech Corp.) に RNA を含む抽出液 750 μL を加え、マイクロ冷却遠心機 3700 (Kubota Corp.) で遠心分離 (10000 g, 30 秒, 室温) によりカラム中の白膜に RNA を吸着させた。同様の操作により抽出液すべてを白膜に吸着させた後、70% (v/v) エタノール 500 μL をカラムに加え、遠心分離 (10000 g, 1 分, 室温) することでカラム内を洗浄した。その後、カラム内を乾燥させるために遠心分離 (15000 g, 2 分, 室温) した。ゲノム DNA 排除のための DNase 処理には Recombinant DNaseI (Takara Bio Inc.) を用い、カラム中の白膜に DNase 処理を行った。室温で 15 分間静置した後、70% (v/v) エタノール 500 μL を加え、遠心分離 (10000 g, 1 分, 室温) による洗浄を 2 回行った。カラム内を乾燥させるために遠心分離 (15000

g, 2分, 室温) した後、30 μ L Milli-Q 水をカラムに加え、5分間静置した。カラムに新しいマイクロチューブを装着した後、遠心分離 (10000 g, 1分, 室温) し、抽出した RNA 含有の Milli-Q 水をマイクロチューブに採取した。抽出した RNA の純度確認のために、1%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、臭化エチジウムによる染色後、バンドを確認した。また、分光光度計 (SmartSpec Plus, Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて、260 nm における吸光度を測定し RNA の濃度を決定した。cDNA は抽出した RNA 0.5 μ g から ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO Co., Ltd.) および 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い合成した。合成した cDNA は Milli-Q 水で 5 倍希釈し、定量 RT-PCR に供試した。

2.2.10 定量 RT-PCR による遺伝子発現解析

合成・希釈した cDNA をテンプレートに KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix ABI Prism (Kapa Biosystems Inc.) と StepOnePlus Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、定量 RT-PCR を行った。定量 RT-PCR に供試したプライマー (Table 2.1) は Primer 3 Plus によりデザインし、遺伝子発現量は比較 Ct 法から算出した。ハウスキーピング遺伝子には *VvActin*、*VvAIG1* および *VvTCPB* を用いた (González-Agüero et al., 2013)。

2.2.11 統計解析

データはすべて平均値 \pm 標準誤差で表した。処理区間の平均値は SPSS statistics version 26 (International Business Machines Corp.) を用いて *t* 検定を行い、5%または 1%水準で有意差検定を行った。

Table 2.1 Primer sequences used in quantitative RT-PCR analysis.

Gene name		Forward/Reverse primer (5'-3')	Accession No.
<i>VvARF6</i>	(F)	TTGCAGCAATCTCAGCCTCAAC	XM_002279772
	(R)	GTGCTGATGCTGCAAATGTTGC	
<i>VvARF8</i>	(F)	ATTGGTTGCGTGCAAGACC	XM_002266642
	(R)	AATGTTTCGGCTTGGAGTTGG	
<i>VvARF17</i>	(F)	CGGTGCAGCATTGTGTTGTTTAC	XM_002284292
	(R)	AACCAGTGGTGAGCAAATGCC	
<i>VvActin</i>	(F)	ATGTGCCTGCCATGTATGTTGC	AF369524
	(R)	AATACCAGTTGTACGCCCACTG	
<i>VvAIG1</i>	(F)	ACAATTGGCAGAAGAGCAAGCG	XM_002281960
	(R)	TTGATGCCAACTGTGCTCTCTG	
<i>VvTCPB</i>	(F)	GAGCGTTTGGTTTTGGCTTGTG	XM_002285876
	(R)	AAACAAGTCCAGCCCAACCAAG	

2.3 結果

2.3.1 水ポテンシャル

無処理区における葉の水ポテンシャルは処理 0 日後の -0.82 MPa から -0.99 MPa (処理 4 日後)、 -1.93 MPa (処理 8 日後) と減少した (Fig. 2.1a)。一方で、Abz-E3M 処理区では -0.75 MPa (処理 4 日後)、 -1.44 MPa (処理 8 日後) と減少し、処理 4 および 8 日後における Abz-E3M 処理区の葉の水ポテンシャルは無処理区よりも有意に高かった。また再灌水処理により、無処理区の葉の水ポテンシャルは -1.22 MPa まで、Abz-E3M 処理区では -0.76 MPa まで増加し、処理 11 日後における Abz-E3M 処理区の葉の水ポテンシャルは無処理区よりも有意に高かった。

2.3.2 気孔コンダクタンス

無処理区における気孔コンダクタンスは処理 1 日後にやや増加した後、処理 4 日後にかけて著しく減少した (Fig. 2.1b)。一方で、Abz-E3M 処理区の気孔コンダクタンスは処理 1 日後から処理 8 日後まで徐々に減少した。Abz-E3M 処理区の気孔コンダクタンスは処理 1 日後において無処理区よりも有意に低く、処理 4 日後には有意に高かった。また、両処理区とも再灌水処理により気孔コンダクタンスが増加した。

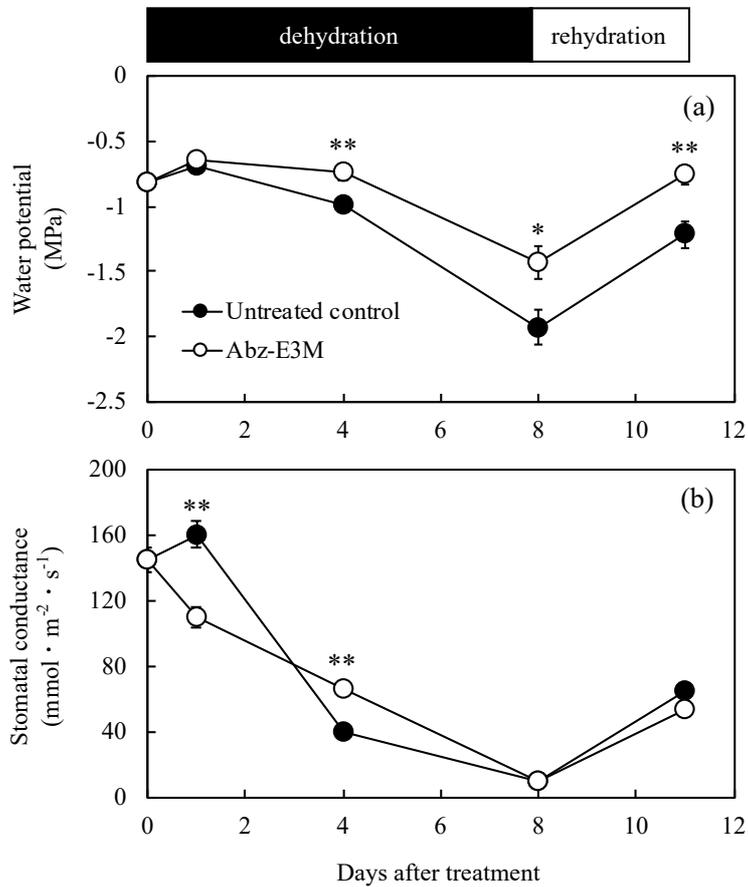


Fig. 2.1 Changes in water potential (a) and stomatal conductance (b) in grape leaves under dehydration and rehydration conditions. Data are means \pm SE (n=6 for water potential, n=12 for stomatal conductance). Asterisks indicate significant differences between the untreated control and Abz-E3M-treated groups by *t*-test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

2.3.3 プロリン濃度

無処理区におけるプロリン濃度は処理 1 日後から増加し、処理 8 日後にピークとなった (Fig. 2.2a)。一方で、Abz-E3M 処理区におけるプロリン濃度は処理 4 日後まで一定であり、処理 8 日後にかけて増加した。処理 4 日後および 8 日後における Abz-E3M 処理区のプロリン濃度は無処理区よりも有意に低かった。また、両処理区とも再灌水処理によりプロリン濃度が減少した。

2.3.4 DPPH ラジカル消去活性

無処理区における DPPH ラジカル消去活性は乾燥ストレス処理 4 日後から 8 日後にかけて著しく増加した (Fig. 2.2b)。一方で Abz-E3M 処理区では緩やかに増加し、処理 8 日後において、Abz-E3M 処理区のプロリン濃度は無処理区よりも有意に低かった。

2.3.5 内生 ABA、PA および DPA 濃度

両処理区における内生 ABA および PA 濃度は乾燥ストレスにより増加し、再灌水処理により減少した (Fig. 2.3a, b)。処理 4 日後における Abz-E3M 処理区の内生 ABA 濃度は無処理区よりも有意に高かった。一方で内生 PA 濃度は、処理 4 日後および 8 日後の Abz-E3M 処理区で無処理区よりも有意に低かった。無処理区の内生 DPA 濃度は乾燥ストレス処理 4 日後に急増した後、処理 8 日後に減少し、再灌水処理で急増した (Fig. 2.3c)。一方で Abz-E3M 処理区の内生 DPA 濃度は、処理 8 日後まで緩やかに増加し、無処理区と同様に再灌水処理で急増した。処理 4 日後における Abz-E3M 処理区の内生 DPA 濃度は無処理区よりも有意に低かった。

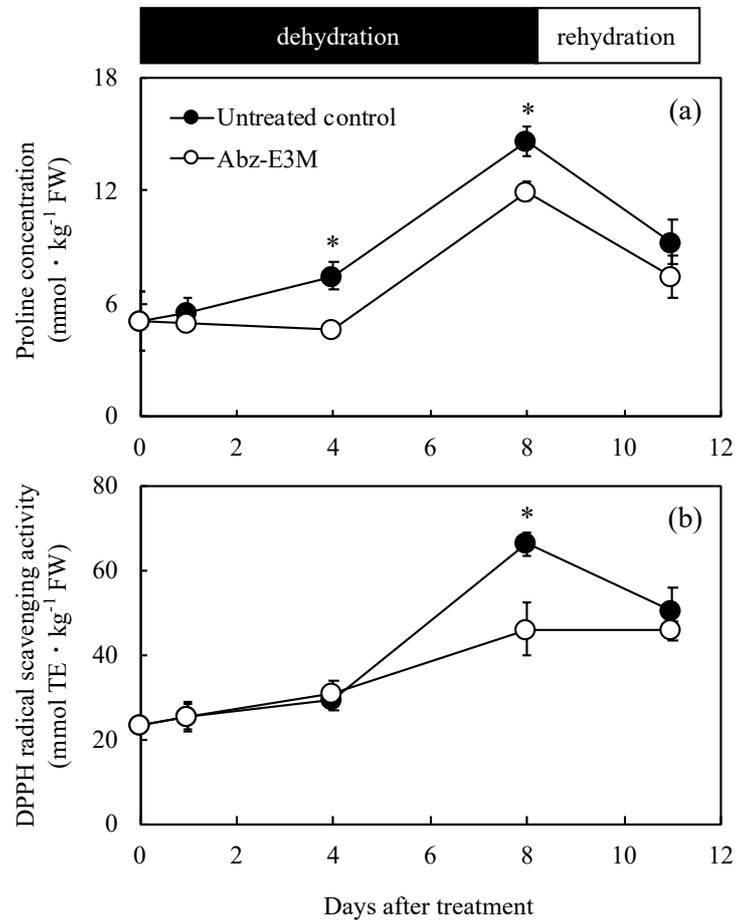


Fig. 2.2 Changes in proline concentration (a) and DPPH radical scavenging activity (b) in grape leaves under dehydration and rehydration conditions. Data are the means \pm SE (n=3). Asterisks indicate significant differences between the untreated control and Abz-E3M-treated groups by *t*-test (*, $P < 0.05$).

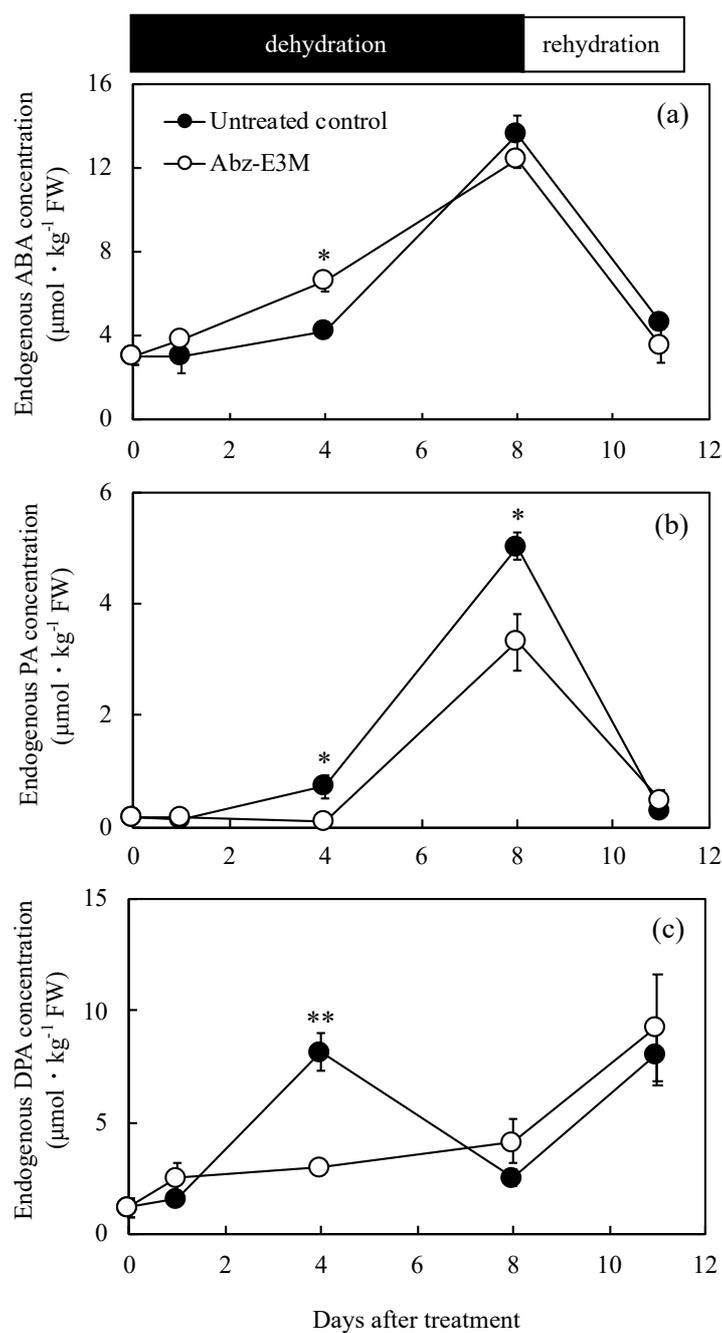


Fig. 2.3 Changes in endogenous concentration of ABA (a), PA (b), and DPA (c) in grape leaves under dehydration and rehydration conditions. Data are the means \pm SE (n=3). Asterisks indicate significant differences between the untreated control and Abz-E3M-treated groups by *t*-test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

2.3.6 内生 IAA 濃度

無処理区において、葉中の内生 IAA 濃度は乾燥ストレス処理 8 日後に増加し、再灌水処理で減少した (Fig. 2.4a)。一方で Abz-E3M 処理区における葉中の内生 IAA 濃度は処理 1 日後から増加し、無処理区と同様に再灌水処理で減少した。処理 1 日後、4 日後および 8 日後における Abz-E3M 処理区の葉中の内生 IAA 濃度は無処理区よりも有意に高かった。挿し穂基部中の内生 IAA 濃度は両処理区とも乾燥ストレス処理 1 日後に増加し、その後減少した (Fig. 2.4b)。処理 1 日後および 4 日後における Abz-E3M 処理区の挿し穂基部中の内生 IAA 濃度は無処理区よりも有意に高かった。

2.3.7 挿し木発根率

乾燥ストレス処理開始時の挿し木発根率は $23.8 \pm 3.8\%$ であった (Fig. 2.5)。両処理区とも挿し木発根率は乾燥ストレス下で徐々に増加した。処理 8 日後において、無処理区の挿し木発根率は $68.6 \pm 2.0\%$ であった。一方で、Abz-E3M 処理区の挿し木発根率は $80.4 \pm 2.0\%$ となり、無処理区よりも有意に増加した。

2.3.8 *VvARFs* 遺伝子発現

両処理区とも *VvARF6* 遺伝子発現量は処理 4 日後に増加し、Abz-E3M 処理区における *VvARF6* 遺伝子発現量が無処理区に比べ有意に高かった (Fig. 2.6a)。また両処理区における *VvARF8* 遺伝子発現量は乾燥ストレス処理により増加し、再灌水処理で減少した。処理 4 日後および 8 日後における、Abz-E3M 処理区の *VvARF8* 遺伝子発現量は無処理区よりも有意に高かった (Fig. 2.6b)。無処理区における *VvARF17* の遺伝子発現量は乾燥ストレスに伴い増加し、処理 8 日後にピークとなった (Fig. 2.6c)。一方で、Abz-E3M 処理区における *VvARF17* の遺伝子発現量は処理 4 日後にピークとなった。処理 8 日後における Abz-E3M 処理区の

VvARF17 遺伝子発現量は無処理区よりも有意に低かった。

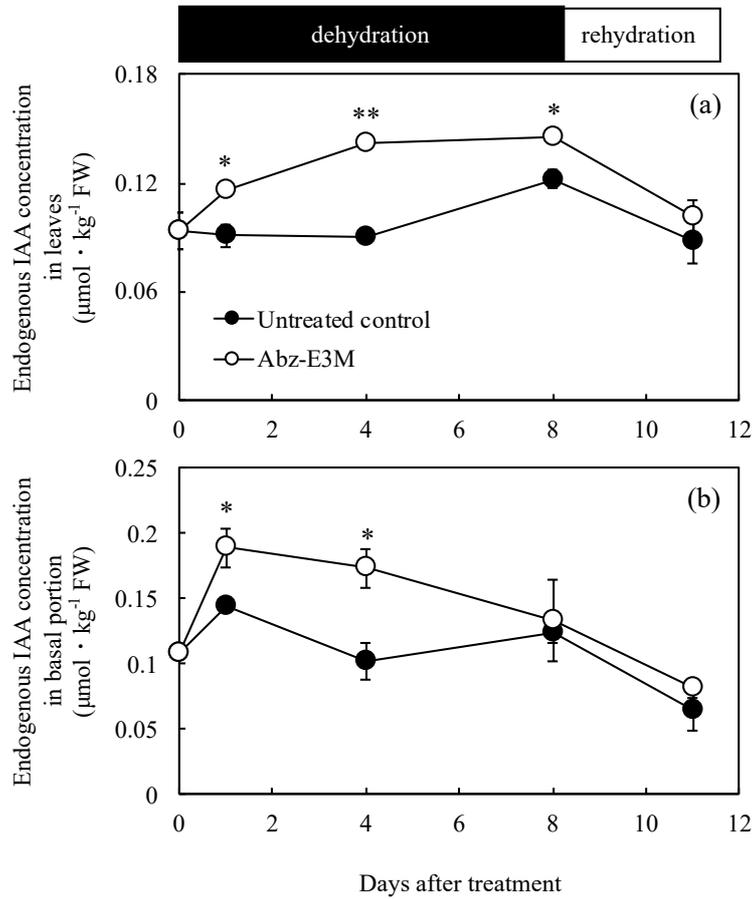


Fig. 2.4 Changes in endogenous IAA concentration in the leaves (a) and the basal portion (b) of grape cuttings under dehydration and rehydration conditions. Data are the means \pm SE (n=3). Asterisks indicate significant differences between the untreated control and Abz-E3M-treated groups by *t*-test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

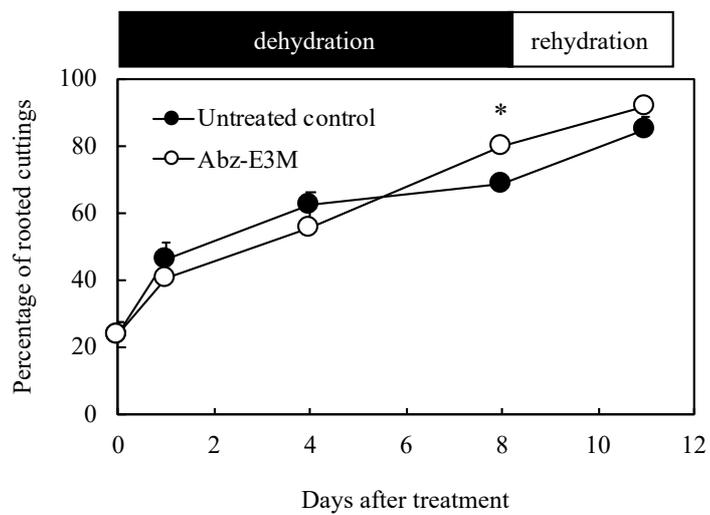


Fig. 2.5 Changes in rooting percentage in grape cuttings under dehydration and rehydration conditions. Data are the means \pm SE (n=3). Asterisks indicate significant differences between the untreated control and Abz-E3M-treated groups by *t*-test (*, $P < 0.05$).

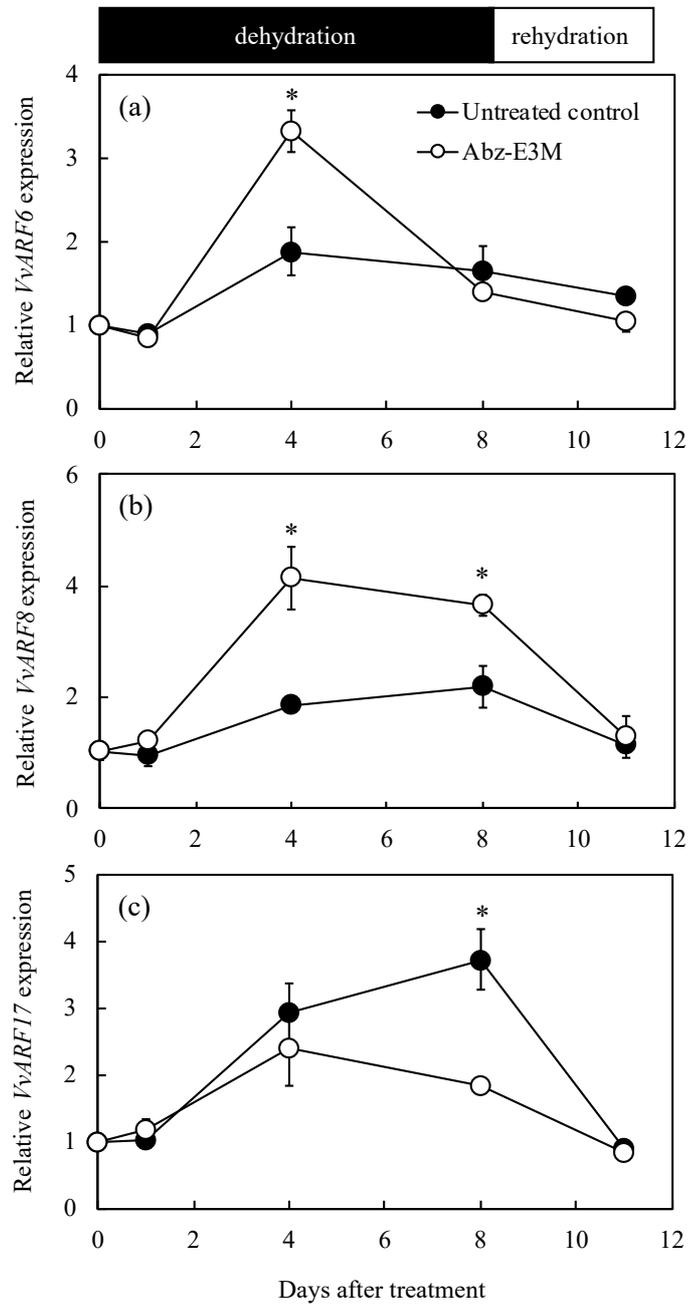


Fig. 2.6 Changes in gene expression of *VvARF6* (a), *VvARF8* (b), and *VvARF17* (c) in the basal portion of grape cuttings under dehydration and rehydration conditions. Data are the means \pm SE (n=3). Asterisks indicate significant differences between the untreated control and Abz-E3M-treated groups by *t*-test (*, $P < 0.05$).

2.4 考察

本研究において、葉中の内生 ABA および ABA 代謝物濃度について分析したところ、Abz-E3M 処理により ABA 代謝物である PA および DPA 濃度が減少し、内生 ABA 濃度が増加した。水分ストレス下の植物における ABA 合成は気孔閉鎖を誘導することが報告されている (Ikegami et al., 2009)。本研究においても、乾燥ストレス処理により気孔コンダクタンスの減少が認められた。Abz-E3M 処理区において処理 1 日後の気孔コンダクタンスが有意に低かった。この結果は、Abz-E3M 処理による気孔への影響が処理後 1 日以内に起こることを示唆している。Kondo ら (2012) はリンゴ実生において、ABA8'位水酸化酵素阻害剤 Abz-F2 処理 4 時間後に気孔閉鎖が誘導されたことを報告している。一方で、処理 4 日後における無処理区の気孔コンダクタンスは Abz-E3M 処理区よりも有意に低下した。これは処理 4 日後の無処理区において、乾燥ストレスによる著しい気孔閉鎖の誘導によるものであると推察された。また ABA は適合溶質の蓄積を誘導する。本研究においても、乾燥ストレス処理によるプロリン蓄積が認められた。Abz-E3M 処理は葉中へのプロリン蓄積を有意に減少させた。さらに、乾燥ストレスは過酸化水素や O_2^- などの ROS 含量を増加させることで、酸化ストレスを誘導する (Meng et al., 2014)。ブドウでは乾燥ストレス下において、スーパーオキシドディスムターゼ、ペルオキシダーゼおよびカタラーゼなどの抗酸化酵素が活性化することが報告されている (Salazar-Parra et al., 2012; Min et al., 2019)。また、DPPH ラジカル消去活性も水分ストレスにより活性化する (Sales et al., 2017; Kowitcharoen et al., 2018)。そこで本研究では、DPPH ラジカル消去活性について検討したところ、Abz-E3M 処理により DPPH ラジカル消去活性は低下した。この結果は、Kondo ら (2012) および Sales ら (2017) の報告と一致し、Abz-E3M 処理により乾燥ストレスが緩和されていることを示唆している。

不定根の形成は環境条件や内生および外生物質の影響を受ける (Shiozaki et al.,

2013)。内生物質の中でもオーキシンは根の形成に中心的な役割を担っている。植物中で最も主要なオーキシンである IAA は不定根形成を制御することが知られている (Pacurar et al., 2014; Guan et al., 2015)。本研究において、Abz-E3M 処理区における挿し穂基部中の内生 IAA 濃度は無処理区よりも高かった。Kawai (1996) はブドウの挿し木において、挿し穂基部中の内生 IAA 含量が地上部の内生 IAA 含量に依存していることを報告した。本研究では、地上部の内生 IAA 濃度が高かった Abz-E3M 処理区において、挿し穂基部の内生 IAA 濃度も高くなった。また、バナナ、サトウキビおよびホソムギにおいて、乾燥ストレスが葉中の ABA および IAA 蓄積を促進させることが報告されている (Mahouachi et al., 2014; Zhang et al., 2015; Li et al., 2016)。さらにイネの実生において、CYP707A をコードする遺伝子 *OsABAox2* を欠損させた変異体で ABA と IAA 含量の増加が報告されている (Zhang et al., 2019)。本研究における、葉中の内生 ABA および IAA 濃度の結果はこれらの報告と一致した。Kelen and Ozkan (2003) はブドウの挿し木において、挿し穂基部中の IAA 含量と発根率に正の相関関係があることを示している。本研究においても、挿し穂基部の内生 IAA 濃度が高かった Abz-E3M 処理区における挿し木発根率が無処理区よりも高くなった。オーキシンは ARFs 遺伝子発現を制御することで、成長や発育に影響を及ぼしている (Liscun and Reed, 2002)。Hagen and Guilfoyle (2002) によりシロイヌナズナから 23 つの ARF 遺伝子が明らかにされて以降、いくつかの果樹における ARF 遺伝子の単離が行われた。例えば、リンゴでは 31 つの ARF 遺伝子が Luo ら (2014) により、カンキツ類では 19 つの ARF 遺伝子が Li ら (2015) により明らかとされた。またブドウにおいては、19 つの ARF 遺伝子が単離されている (Wan et al., 2014)。Sorin ら (2005) は不定根形成への ARF 遺伝子の関与がオーキシン依存的であることを示した。シロイヌナズナでは *ARF6* および *ARF8* が不定根形成にポジティブに、*ARF17* がネガティブに機能する。本研究では、Abz-E3M 処理により *VvARF6*

および *VvARF8* の遺伝子発現が有意に増加し、*VvARF17* の遺伝子発現が有意に減少した。オオムギにおいて 100 μ M の ABA 処理が IAA の前駆物質であるトリプトファンを増加させた (Ogura et al., 2001)。また、ABA 合成阻害剤であるフルリドン処理がイネの内生 IAA 濃度を減少させた (Du et al., 2013)。さらに、Xie ら (2020) はシロイヌナズナにおいて、シュートへの ABA 処理がオーキシンの求基的極性移動を促進させることで根端におけるオーキシン蓄積を促進したことを示した。すなわち本研究において、Abz-E3M 処理は挿し穂葉中の内生 IAA 濃度を増加させることで、挿し穂基部中の内生 IAA 濃度も増加させ、*VvARF6*、*VvARF8* および *VvARF17* の遺伝子発現を制御することで、不定根発根を促進したと考えられた。

2.5 結論

ブドウ挿し木において、乾燥ストレス処理前に Abz-E3M を挿し穂に葉面散布すると、ABA の水酸化を阻害し、内生 ABA 濃度を調節することで、乾燥ストレス耐性を向上させた。また、Abz-E3M 処理区では葉中および挿し穂基部中の内生 IAA 濃度も増加しており、不定根発根に関与している *VvARF6* および *VvARF8*、*VvARF17* の遺伝子発現を制御することで発根率を高めた (Fig. 2.7)。本研究の結果は、乾燥ストレス下のブドウ挿し木において、ABA8'位水酸化酵素 CYP707A 阻害剤処理が乾燥ストレス耐性および不定根発根の促進に効果的な方法であることを示唆している。

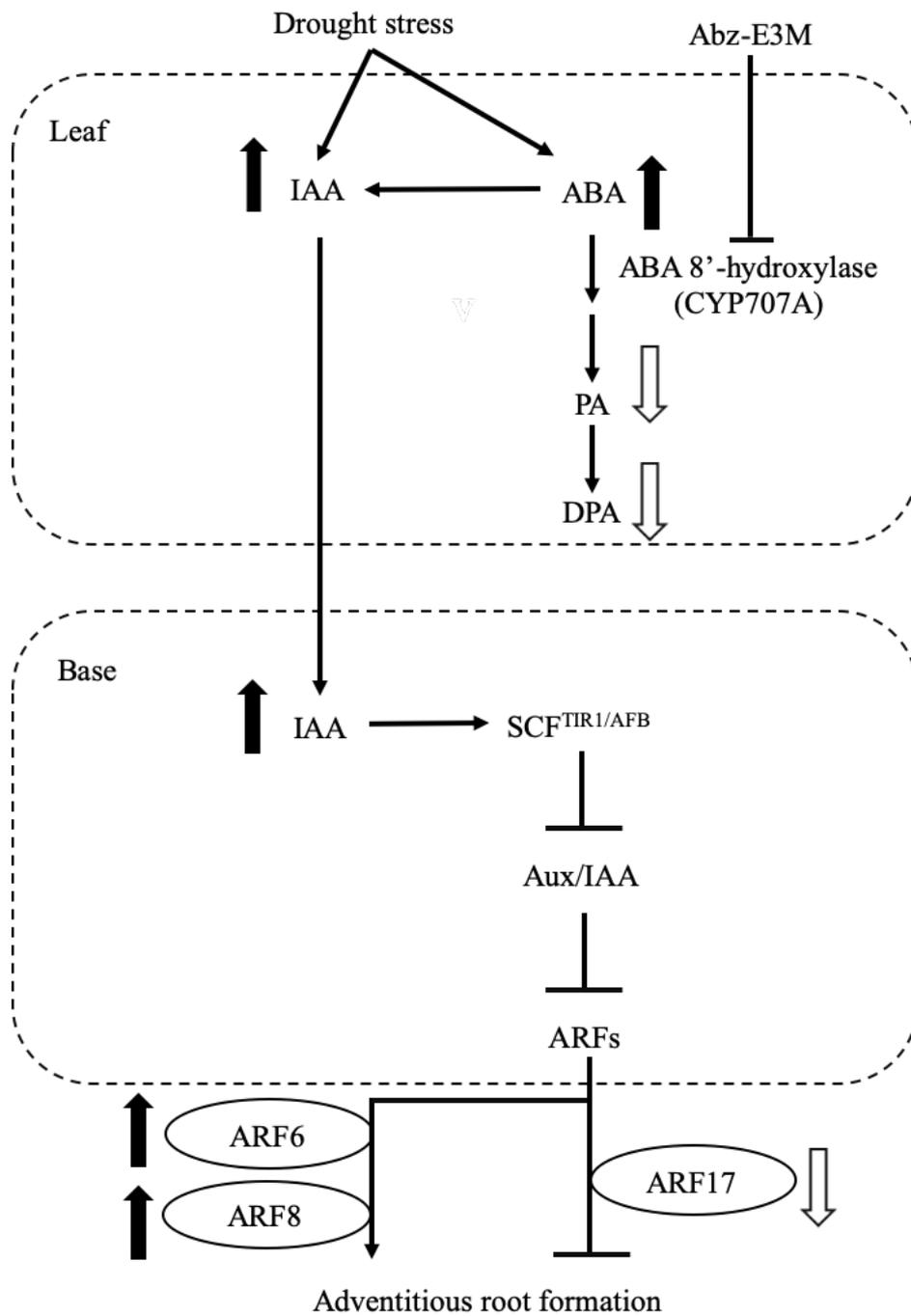


Fig. 2.7 Schematic diagram of the regulation of dehydration tolerance and adventitious rooting in grape cuttings by Abz-E3M treatment. Dark arrows indicate increase. Blank arrows indicate decrease.

第3章 収穫後の高温ストレス処理+ABA 合成阻害剤処理が

ウメ果実の追熟に及ぼす影響

3.1 緒言

ウメ (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) 果実は緑熟期に収穫し、梅酒や梅干しなどに加工し利用されているが、ウメ果実は日持ち性が悪いことが問題となっている。一般的に、果実や野菜などの日持ち性を向上させる方法として、低温貯蔵が効果的であることが知られている。しかし、ウメ果実は低温障害を生じることから低温貯蔵に適さない果実であり (Imahori et al., 2008; Endo et al., 2019)、ウメ果実の日持ち性を向上させるための効果的な技術が求められている。ウメ果実は貯蔵中にエチレン産生が認められるクライマクテリック型果実に分類される。エチレンは果実の小胞体膜にある Ethylene response 1 (ETR1) および Ethylene response sensor 1 (ERS1) などのエチレン受容体で認識された後、Constitutive triple response 1 (CTR1) から下流へとシグナル伝達を行う (Ju and Chang, 2015)。追熟中の果実ではエチレン産生の増加に伴いエチレン受容体および CTR1 遺伝子の発現が増加することが報告されている (El-Sharkawy et al., 2007)。

植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) は非クライマクテリック型果実の成熟に関与していることが知られている (Wheeler et al., 2009; Jia et al., 2011) が、ウメを含むクライマクテリック型果実の追熟への関与も示唆されている (Setha et al., 2004; Mou et al., 2016; Wang et al., 2019)。ABA 合成の律速段階は 9-*cis*-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼ (NCED) によるキサントキシンの生成である。ABA のシグナル伝達はタンパク質脱リン酸化酵素 Protein phosphatase 2Cs (PP2Cs) により抑制されており、ABA 受容体が ABA を認識した後に PP2Cs の活性を阻害することでシグナル伝達が活性化する (Umezawa et al., 2009)。近年、様々な植物における PP2Cs の単離および機能解析が行われている。例えば、シ

ロイヌナズナでは *AtABII* および *AtPP2CA* の 2 つの PP2C が ABA シグナル伝達に関与していることが報告されている (Krzywinska et al., 2016)。またブドウにおいては、*VvPP2C4* および *VvPP2C9* が ABA 受容体に結合する主要な PP2C であることが見いだされた (Boneh et al., 2012)。ノルジヒドログアイアレチン酸 (NDGA) は NCED に作用することで ABA 合成を阻害する (Creelman et al., 1992)。これまでに NDGA 処理がクライマクテリック型果実の追熟に及ぼす影響についていくつか報告されている。例として、外生 NDGA 処理によりチェリートマトやマンゴールのエチレン産生が抑制された (Mou et al., 2016; Zaharah and Singh, 2012)。

収穫後の高温ストレス処理は果実のエチレン産生や呼吸に影響することが報告されている。例えば、収穫後の温風処理はスモモ果実のエチレン産生および呼吸のクライマクテリックライズを遅延させた (Luo et al., 2010)。また収穫後の温水浸漬処理はライム果実およびアンズ果実の呼吸およびエチレン産生量を減少させた (Kaewsuksaeng et al., 2015; Wu et al., 2015)。一方で、高温ストレス処理は内生 ABA 蓄積を促進させることが、タバコやブドウなどで報告されている (Teplova et al., 2000; Abass and Rajashekar, 1993)。そのため、ウメ果実の追熟抑制には高温ストレスと ABA 合成阻害剤の併用処理によるエチレン産生および ABA 合成の両方を阻害することが効果的であるかもしれない。

そこで本研究では、収穫後の温水処理および NDGA 処理の併用処理がウメ果実の追熟に及ぼす影響について検討した。

3.2 材料および方法

3.2.1 供試材料

供試材料には、本研究科研究圃場栽植のウメ‘稲積’ (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) 成木 2 樹から収穫した果実を供試した。緑熟期に果実を収穫し、サイズおよび果皮色が均一になるように 336 果を選別した。

3.2.2 温水処理および NDGA 処理

選別した 336 果をランダムに 4 つの処理区 (①温水処理区, ②NDGA 処理区, ③温水+NDGA 処理区, ④無処理区) に分け、1 処理区あたり 84 果とした。温水処理は果実を 40°C の蒸留水に 5 分間浸漬した後、冷却のために直ちに 22°C の蒸留水に 5 分間浸漬させた。NDGA 処理は果実を 22°C の NDGA (100 μ M) 溶液に 5 分間浸漬させた。温水+NDGA 処理は果実を 40°C の蒸留水に 5 分間浸漬した後、22°C の NDGA (100 μ M) 溶液に 5 分間浸漬させた。無処理区は果実を 22°C の蒸留水に 5 分間浸漬させた。いずれの果実も処理後に果実表面を自然乾燥し、有孔低密度ポリエチレン袋 (厚さ 0.03 mm, 18 cm×27 cm) に 7 果/袋となるように袋詰めし、温度 25°C、相対湿度 95%、暗黒下で貯蔵した。

3.2.3 サンプルング

サンプルングは処理 0、1、3 および 6 日後に行った。一度のサンプルングで処理区あたり 3 袋をランダムに選び、3 反復とした (計 21 果)。果皮色および果肉硬度の測定後に、果皮のみを液体窒素で凍結させ、分析まで -80°C の冷凍庫中で保存した。果皮色および果肉硬度、総クロロフィル含量、エチレン産生量の測定は処理 0、3 および 6 日後に行い、内生 ABA 濃度および遺伝子発現解析は処理 0、1、3 および 6 日後のサンプルを使用した。

3.2.4 果肉硬度の測定

果肉硬度の測定にはレオメーターCR-100 (Sun Scientific Co., Ltd.) を用いた。ランダムに選んだ果実の赤道面 2 ヶ所を付属の進入弾性用プランジャー (直径 3 mm) を用い、試料台速度 100 mm/分、進入深度 3 mm に設定した定深度測定モードで測定した。2 ヶ所における平均値を果肉硬度とした。

3.2.5 果皮色の測定

果皮色の測定には色彩色差計 CM-2002 (Konica Minolta Inc.) を用いた。ランダムに選んだ果実の赤道面 3 ヶ所における $L^*a^*b^*$ 値を測定後、平均値を求め、McLellan ら (1995) の方法に基づいて、以下の式から色相角を算出した。

色相角 ($^{\circ}$) = $\arctan (b^*/a^*) \cdot \cdot \cdot a^*$ 値が+である場合

色相角 ($^{\circ}$) = $180^{\circ} + \arctan (b^*/a^*) \cdot \cdot \cdot a^*$ 値が-である場合

3.2.6 総クロロフィル含量の測定

クロロフィルの抽出および測定は Porra ら (1989) の方法に従った。すなわち、凍結保存した果皮 0.5 g を 3 mL の *N, N*-ジメチルホルムアミドに浸漬し、4°C、暗黒下で 24 時間静置することでクロロフィルを抽出した。その後、分光光度計 U-2910 (Hitachi Ltd.) を用い、抽出液の 647 nm および 664 nm における吸光度 A_{647} および A_{664} を測定した。総クロロフィル含量は Porra ら (1989) に従い下記の計算式から算出した。

総クロロフィル含量 ($\mu\text{g/mL}$) = $17.67A_{647} + 7.12A_{664}$

3.2.7 エチレン産生量の測定

エチレン産生量の測定は Nimitkeatkai ら (2011) の方法を参考にガスクロマトグラフィー (GC) による分析を行った。ウメ果実 7 果を容積 1.7 L のプラスチック容器内に入れ、密閉した後 25°C 下で 1 時間静置した。その後、容器内のヘッドスペースガスを注射器で採取し、採取したヘッドスペースガス 1 mL を GC-2014 (Shimadzu Corp.) に打ち込んだ。カラムには Porapak Q 充填カラム (2.0 m×2.2 mm, Waters Corp.) を用い、カラム温度は 50°C に設定した。検出には水素炎イオン化検出法 (FID) を用い、検出器の温度は 150°C とした。キャリアガスは窒素とし、流速は 30 mL/分とした。

3.2.8 内生 ABA の抽出・分析

ABA の抽出は Kondo ら (2014) を参考に行った。0.5 g の凍結サンプルに内部標準として 0.2 µg の [²H₆]-ABA を加え、0.1% (w/v) ジブチルヒドロキシトルエンおよび 0.1% (w/v) L(+)-アスコルビン酸含有の 80% (v/v) メタノール 10 mL とともに氷中でホモジナイザー (PHYSCOTRON NS-52, Microtec Co., Ltd.) を用いて粉碎した。氷中、暗黒下で 1 時間振盪させた後、微量高速遠心機 (CF15RN, Eppendorf HimaC Technologies Co., Ltd.) で遠心分離 (15000 g, 15 分, 4°C) し、上清を濾過した。濾液はロータリーエバポレーターを用いて乾固した。20 mL の蒸留水で溶解後、溶液の pH が 2.5 となるように 1 M 塩酸を加えた。その後、20 mL の酢酸エチルとともに分液ロート中で分離させ、酢酸エチル層を回収した。酢酸エチルによる分配は 3 回行い、回収した酢酸エチル層はロータリーエバポレーターで乾固した。1 mL の 100% メタノールで再溶解した後、孔径 0.45 µm の Omnipore 親水性 PTFE メンブレンフィルター (Merck Millipore Corp.) で濾過した。その後、濾液 5 µL を液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) により

分析した。HPLCにはLC-2010C(Shimadzu Corp.)を、質量分析にはLCMS-2010EV(Shimadzu Corp.)を用いた。カラムにはODS-Mightysil RP-18GP Aqua カラム(ϕ 5 μ m, 150 mm \times 2 mm, Kanto Chemical Co., Inc.)を用い、カラムオーブンは40°Cとした。移動相には20 mM ギ酸含有の80% (v/v) メタノールを用い、流速は0.3 mL/分に設定した。分析はネガティブモードにおけるイオンモニタリング(SIM)法で行った。ABA濃度はm/z (ABA: 263, [²H₆]-ABA: 269)におけるピーク面積から面積比を算出後、標準曲線から決定した。

3.2.9 総RNA抽出およびcDNA合成

総RNA抽出はLiら(2008)およびHenderson and Hammond(2013)の臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)法を参考に行った。抽出液として15 mLの5 M 酢酸カリウム、500 μ Lの β -メルカプトエタノールおよび35 mLのCTAB バッファー(2% CTAB, 2%ポリビニルピロリドン-40, 2 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0))の混合溶液を作成し、65°C下で温めた。-80°Cの冷凍庫中で凍結保存した果皮0.5 gを液体窒素中で乳鉢、乳棒を用いて粉碎し、粉末を8 mLの抽出液に加えて、65°C下で8分間温めた。微量高速遠心機(CF15RN, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd.)で遠心分離(10000 g, 5分, 室温)した後、上清のみを等量のクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1, v/v)溶液と十分に混合し、遠心分離(10000 g, 10分, 室温)後、上層のみを回収した。上層に対して0.04倍量の3 M 酢酸カリウム溶液および0.7倍量のイソプロパノールを加え、転倒混和した。その後、MicroElute Clean-Up カラム(Favorgen Biotech Corp.)にRNAを含む抽出液750 μ Lを加え、マイクロ冷却遠心機3700(Kubota Corp.)で遠心分離(10000 g, 30秒, 室温)によりカラム中の白膜にRNAを吸着させた。同様の操作により抽出液すべてを白膜に吸着させた後、70% (v/v) エタノール500 μ Lをカラムに加え、遠心分離(10000 g, 1分, 室温)することでカラ

ム内を洗浄した。その後、カラム内を乾燥させるために遠心分離（15000 g, 2 分, 室温）した。ゲノム DNA 排除のための DNase 処理には Recombinant DNaseI (Takara Bio Inc.) を用い、カラム中の白膜に DNase 処理を行った。室温で 15 分間静置した後、70% (v/v) エタノール 500 μ L を加え、遠心分離（10000 g, 1 分, 室温）による洗浄を 2 回行った。カラム内を乾燥させるために遠心分離（15000 g, 2 分, 室温）した後、30 μ L Milli-Q 水をカラムに加え、5 分間静置した。カラムに新しいマイクロチューブを装着した後、遠心分離（10000 g, 1 分, 室温）し、抽出した RNA 含有の Milli-Q 水をマイクロチューブに採取した。抽出した RNA の純度確認のために、1%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、臭化エチジウムによる染色後、バンドを確認した。また、分光光度計（SmartSpec Plus, Bio-Rad Laboratories Inc.）を用いて、260 nm における吸光度を測定し RNA の濃度を決定した。cDNA は抽出した RNA 0.5 μ g から ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO Co., Ltd.) および 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い合成した。合成した cDNA は Milli-Q 水で 5 倍希釈し、定量 RT-PCR に供試した。

3.2.10 定量 RT-PCR による遺伝子発現解析

合成・希釈した cDNA をテンプレートに KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix ABI Prism (Kapa Biosystems Inc.) と StepOnePlus Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、定量 RT-PCR を行った。定量 RT-PCR に供試したプライマー (Table 3.1) は Primer 3 Plus によりデザインし、遺伝子発現量は比較 Ct 法から算出した。ハウスキーピング遺伝子には *PmActin* および *PmUbiquitin* を用いた (Wang et al., 2014)。

3.2.11 統計解析

データはすべて平均値±標準誤差で表した。処理区間の平均値は SPSS statistics version 26 (International Business Machines Corp.) を用いて Tukey's HSD 検定を行い、5%水準で有意差検定を行った。

Table 3.1 Primer sequences used in quantitative RT-PCR analysis.

Gene name		Forward/Reverse primer (5'-3')	Accession No.
<i>PmACSI</i>	(F)	TCCCGAGTTCAGAAAGGCTGT	AB499128
	(R)	ACCAGCCCGAAACTTGACAT	
<i>PmACO1</i>	(F)	GGGCTTCTTTGAGCTTGTGAGT	AB031027
	(R)	TGGGCAATCACTCTGTGCTC	
<i>PmETRI</i>	(F)	TAGTGCAAGGCAATGGCATGTC	AB031028
	(R)	TTGCAGCATGTGACAGAGCAAC	
<i>PmERS1</i>	(F)	ATCTCATTGCGCACAGACCAAC	XM_008236910
	(R)	ACGACCATCGGCTTTCAAACAC	
<i>PmCTRI</i>	(F)	AGCAAGACTTTCATGCCGAACG	XM_008243072
	(R)	TTTGGATGCCGCAGTCGTTTC	
<i>PmNCED1</i>	(F)	CCCCCGTGATCTACGACAAG	XM_008228017
	(R)	ACAACGACTTCGTCCGTCTC	
<i>PmPP2C37-like</i>	(F)	TTCGGACGCCTCCATTTTGTTG	XM_008235259
	(R)	AAAACGACGCCGGATTTAGCAC	
<i>PmUbiquitin</i>	(F)	AAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAG	Pm009747
	(R)	CCACGGAGACGAAGCACCAAA	
<i>PmActin</i>	(F)	CCCTAAGGCTAACAGAGAAAAGA	Pm005252
	(R)	CAGCAAGGTCCAGACGAAGAAT	

3.3 結果

3.3.1 果皮色の外観

Fig. 3.1 に処理 0 日後、3 日後および 6 日後の各処理区における果皮色の外観を示した。処理 3 日後の無処理区において果皮色の黄化が見られたが、温水処理区、NDGA 処理区および温水+NDGA 処理区における果皮色は緑色であった。また処理 6 日後において、果皮色の黄化が見られた温水処理区および NDGA 処理区に比べ、温水+NDGA 処理区では果皮色の黄化が抑えられていた。

3.3.2 果肉硬度

すべての処理区において、果肉硬度は処理 3 日後に急激に低下した (Fig. 3.2a)。処理 3 日後における温水+NDGA 処理区の果肉硬度は他の処理区に比べて、有意に高かった。

3.3.3 色相角

すべての処理区において、果皮における色相角は貯蔵期間中に減少し続けた (Fig. 3.2b)。処理 3 日後および 6 日後において、温水処理区および NDGA 処理区の色相角は無処理区よりも有意に高かった。また、温水+NDGA 処理区の色相角はすべての処理区の中で最も高かった。

3.3.4 総クロロフィル含量

すべての処理区において、果皮中の総クロロフィル含量は貯蔵期間中に減少し続けた (Fig. 3.2c)。処理 3 日後および 6 日後において、温水+NDGA 処理区の総クロロフィル含量は無処理区に比べ有意に高かった。

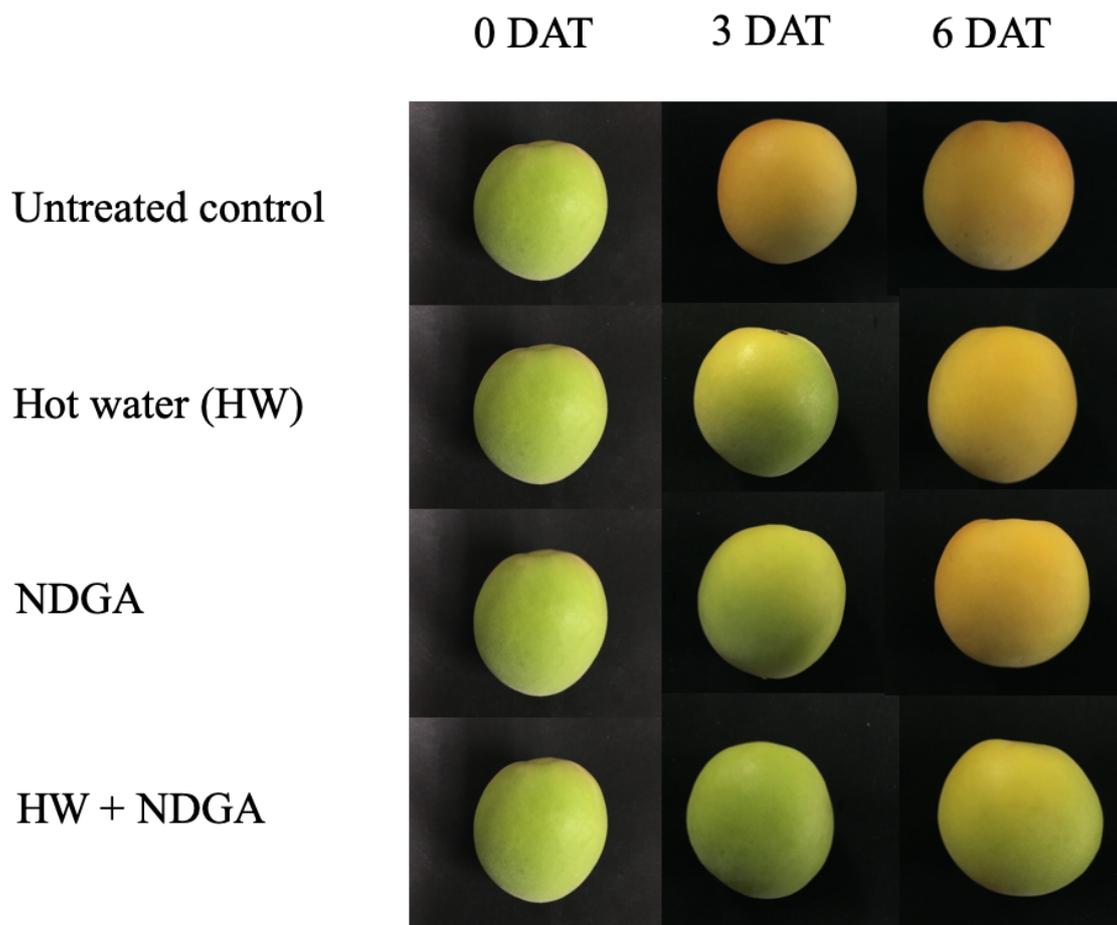


Fig. 3.1 Visual peel color changes in Japanese apricot fruit in untreated control (first row), HW (second row), NDGA (third row) and HW + NDGA (fourth row).

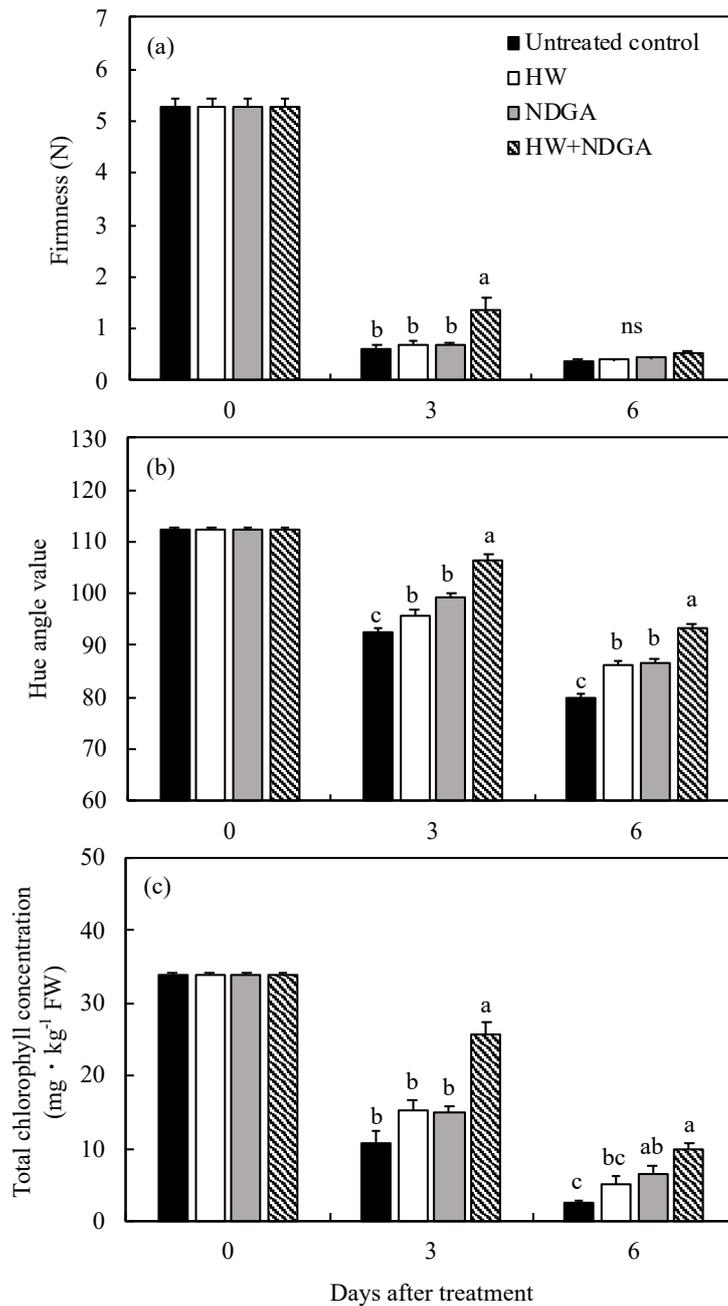


Fig. 3.2 Changes in firmness (a), hue angle value (b), and total chlorophyll concentration (c) in the untreated control and in HW-treated, NDGA-treated, and HW+NDGA-treated fruit. Data are means \pm SE (three replications of seven fruit) and separated by Tukey's HSD test at $P < 0.05$. "ns" indicates not significant.

3.3.5 エチレン産生量

処理前のウメ果実におけるエチレン産生は認められなかった (Fig. 3.3)。無処理区のエチレン産生量は処理 3 日後にピークとなり、処理 6 日後に減少した。処理 3 日後において、温水処理区および NDGA 処理区のエチレン産生量は無処理区よりも有意に減少し、温水+NDGA 処理区のエチレン産生量はすべての処理区で最も低かった。

3.3.6 エチレン関連遺伝子発現

エチレンの合成に関与する遺伝子 *PmACSI* および *PmACOI* の発現量は処理 3 日後に著しく増加した (Fig. 3.4a, b)。処理 1 日後における温水処理区の *PmACSI* および *PmACOI* の遺伝子発現量は無処理区よりも有意に減少した。また、処理 1 日後および 3 日後における NDGA 処理の *PmACSI* 遺伝子発現量は無処理区よりも有意に減少した。温水+NDGA 処理区の *PmACSI* および *PmACOI* 遺伝子発現量は処理 1 日後および 3 日後に無処理区よりも有意に減少した。エチレン受容体およびシグナル伝達に関与する遺伝子 *PmETR1*、*PmERS1* および *PmCTR1* の発現量はいずれも同様の傾向を示した (Fig. 3.5a, b, c)。すなわち、処理 1 日後において、温水処理区における *PmETR1*、*PmERS1* および *PmCTR1* の遺伝子発現量は無処理区よりも有意に減少した。また NDGA 処理区の *PmETR1* および *PmCTR1* の遺伝子発現量は処理 1 日後および 3 日後に無処理区よりも有意に減少した。温水+NDGA 処理区の *PmETR1*、*PmERS1* および *PmCTR1* 遺伝子発現量は処理 1 日後および 3 日後において、無処理区よりも有意に減少した。

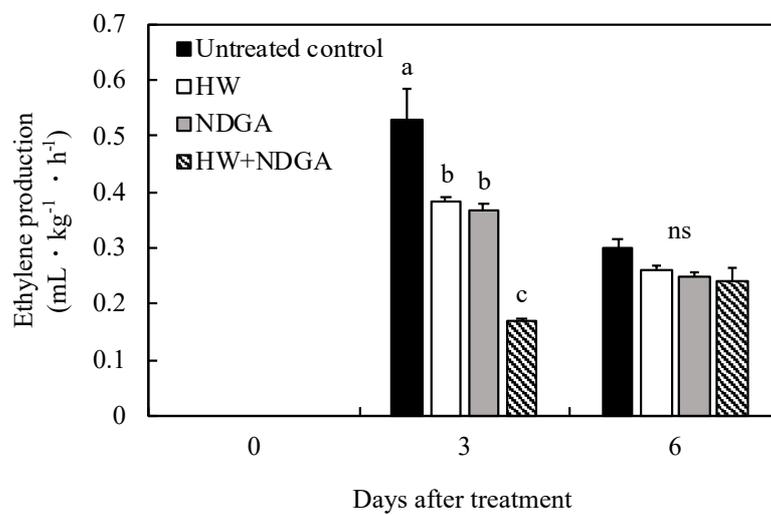


Fig. 3.3 Changes in ethylene production in the untreated control and in the HW-treated, NDGA-treated, and HW+NDGA-treated fruit. Data are means \pm SE (three replications of seven fruit) and separated by Tukey's HSD test at $P < 0.05$. "ns" indicates not significant.

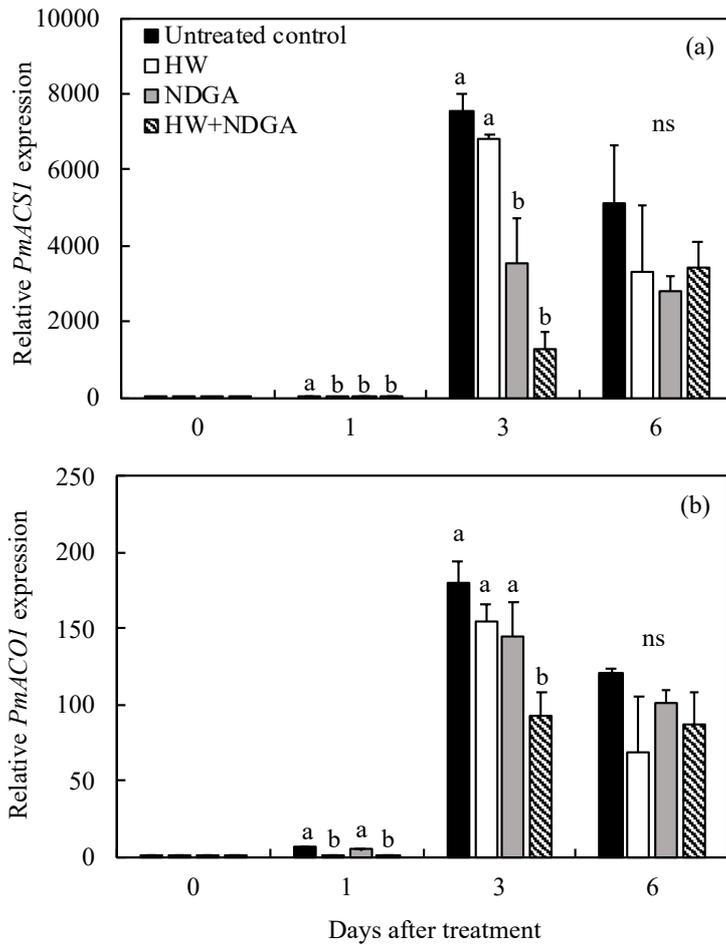


Fig. 3.4 Changes in gene expression of *PmACSI* (a) and *PmACOI* (b) in the untreated control and in the HW-treated, NDGA-treated, and HW+NDGA-treated fruit. Data are means \pm SE (three replications of seven fruit) and separated by Tukey's HSD test at $P < 0.05$. "ns" indicates not significant.

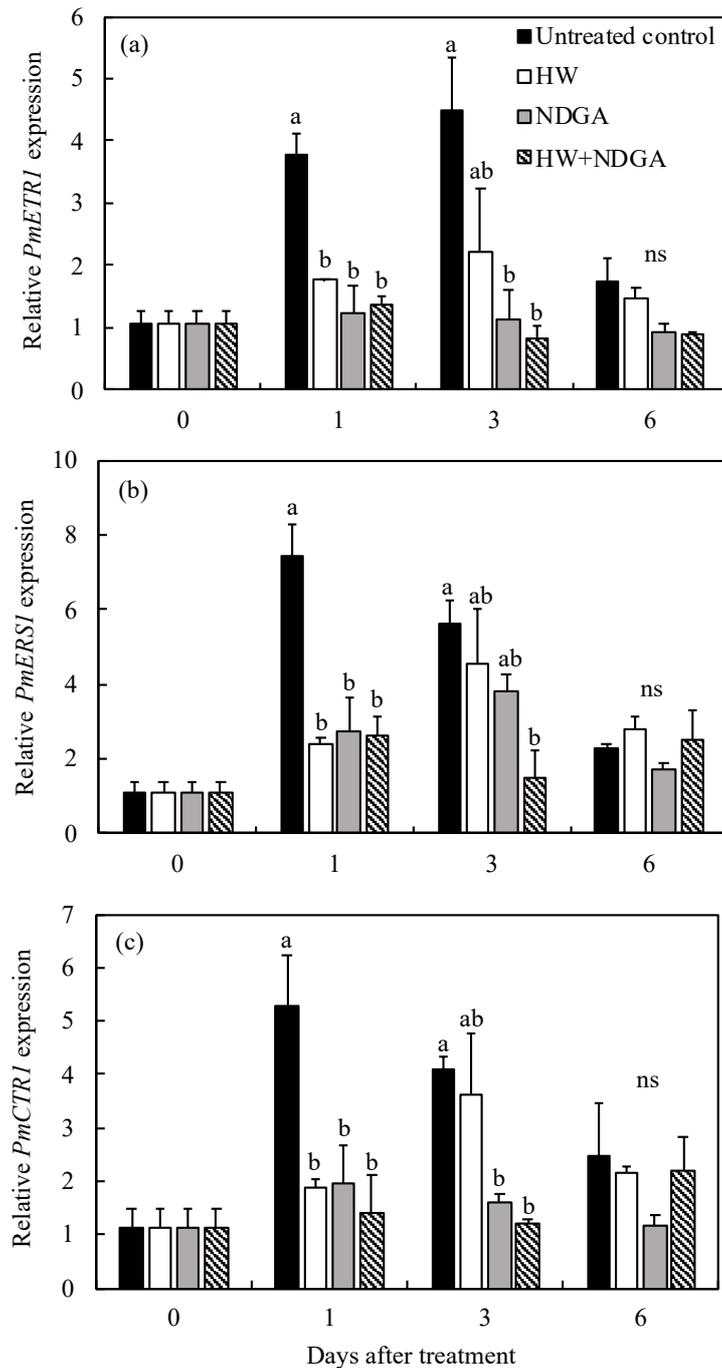


Fig. 3.5 Changes in gene expression of *PmETRI* (a), *PmERSI* (b), and *PmCTRI* (c) in the untreated control and in HW-treated, NDGA-treated, and HW+NDGA-treated fruit. Data are means \pm SE (three replications of seven fruit) and separated by Tukey's HSD test at $P < 0.05$. "ns" indicates not significant.

3.3.7 内生 ABA 濃度

無処理区における内生 ABA 濃度は処理 3 日後にピークとなった後、処理 6 日後に減少した (Fig. 3.6a)。温水処理区の内生 ABA 濃度は、処理 1 日後に無処理区よりも有意に高くなり、処理 3 日後には有意に低かった。NDGA 処理区および温水+NDGA 処理区の内生 ABA 濃度は処理 1 日後および 3 日後において、無処理区よりも有意に減少した。処理 3 日後において、温水+NDGA 処理区の内生 ABA 濃度はすべての処理区の中で最も低かった。

3.3.8 ABA 関連遺伝子発現

ABA 合成の律速酵素遺伝子 *PmNCED1* の発現量は内生 ABA 濃度と同傾向であった (Fig. 3.6b)。すなわち、温水処理区の *PmNCED1* 発現量は処理 1 日後に無処理区よりも有意に高くなり、処理 3 日後には有意に減少した。また、処理 1 日後および 3 日後における NDGA 処理区および温水+NDGA 処理区の *PmNCED1* 遺伝子発現量は無処理区よりも有意に減少した。ABA のシグナル伝達を負に制御している遺伝子 *PmPP2C37-like* の発現量は内生 ABA 濃度および *PmNCED1* 遺伝子発現量と逆の傾向となった (Fig. 3.6c)。すなわち、温水処理区の *PmPP2C37-like* 遺伝子発現量は処理 1 日後に無処理区よりも有意に低くなった。また、処理 3 日後における温水+NDGA 処理区の *PmPP2C37-like* 遺伝子発現量はすべての処理区の中で最も高かった。

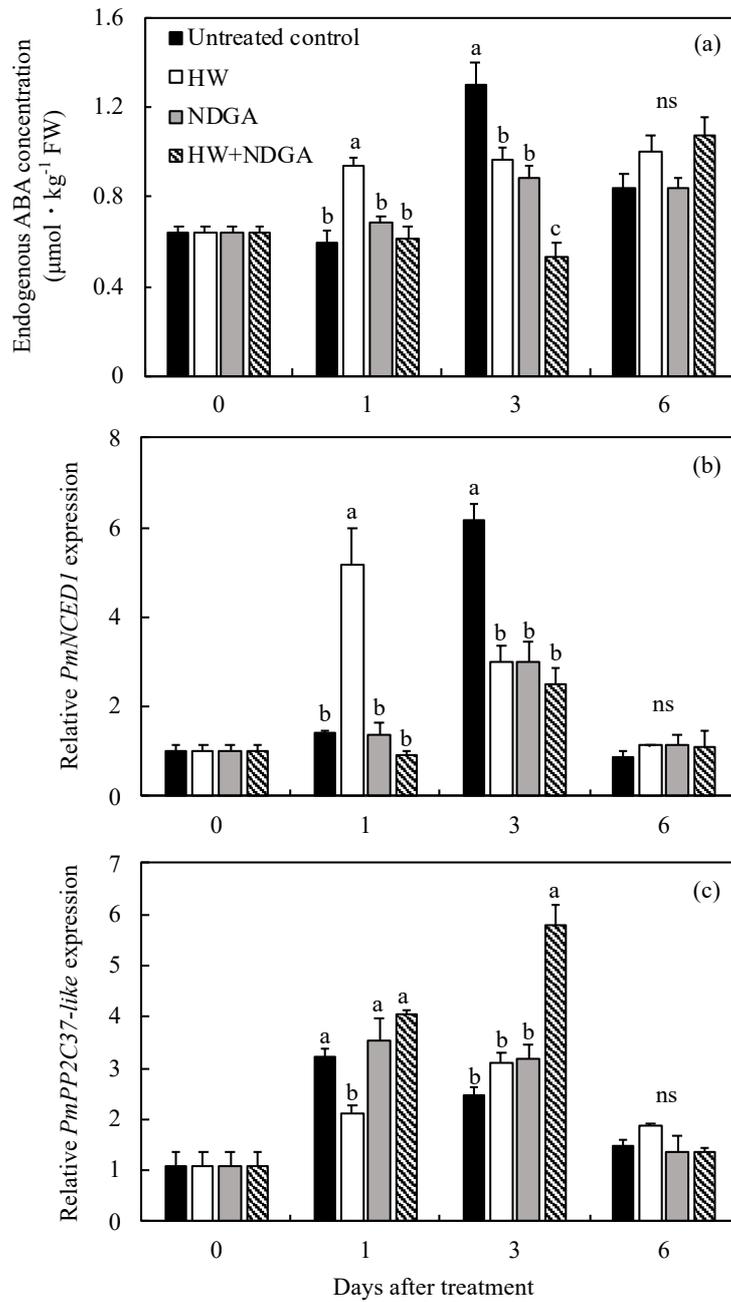


Fig. 3.6 Changes in endogenous ABA concentration (a) and gene expression of *PmNCEDI* (b) and *PmPP2C37-like* (c) in the untreated control and in HW-treated, NDGA-treated, and HW+NDGA-treated fruit. Data are means \pm SE (three replications of seven fruit) and separated by Tukey's HSD test at $P < 0.05$. "ns" indicates not significant.

3.4 考察

本研究において、収穫後の温水+NDGA 処理がウメ果実の軟化および果皮色の黄化を遅延させるのに最も効果的であった。果実の軟化抑制には細胞壁分解関連酵素の不活性化が関連している (Lurie, 1998)。トマト果実において、高温処理はポリガラクチュロナーゼ遺伝子の発現を著しく抑制した (Lurie et al., 1996)。ウメ果実の商品価値の低下は果皮色の黄化から始まる (Zhang et al., 1991)。また、収穫後のウメ果実の果皮色の黄化にはクロロフィル分解が関連している (Wang et al., 2019)。ライム果実において、温水処理が果皮のクロロフィル分解を遅延させ、フェオフォルバイド a やピロフェオフォルバイド a などのクロロフィル分解産物を減少させた (Opio et al., 2017; Kaewsuksaeng et al., 2019)。さらに、収穫前のウメ果実に対する NDGA 処理はクロロフィル分解酵素クロロフィラーゼ遺伝子 *PmCHL1* の遺伝子発現を抑制することで、クロロフィル分解を遅延させた (Wang et al., 2019)。以上のことから、本研究では、温水+NDGA 処理が細胞壁分解酵素やクロロフィル分解酵素の不活性化に最も効果的であった可能性が考えられた。収穫後の温水処理は果実のエチレン産生を制御する効果的な技術の一つである (Opio et al., 2017)。Kesta ら (1999) は、高温処理によるマンゴー果実のエチレン産生の減少が 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) 合成酵素 (ACS) および ACC 酸化酵素 (ACO) の酵素活性の抑制によるものであることを報告した。また、NDGA 処理がウメ果実のエチレン産生を抑制することが示されており (Wang et al., 2019)、本研究の結果はこれらの報告と一致した。エチレン受容体遺伝子 *PmETR1*、*PmERS1* およびエチレンシグナル関連遺伝子 *PmCTR1* の発現量は温水および NDGA 処理により減少した。Mou ら (2016) はチェリートマトの果実に対し、NDGA 処理をすることで、エチレン産生および *LeACS2*、*LeACO1* および *LeACO3* の遺伝子発現を抑制したが、*LeETR1*、*LeERS1* および *LeCTR1* の遺伝子発現には影響しなかったことを示した。植物成長調節物

質が ETR1、ERS1 および CTR1 遺伝子に及ぼす影響は植物種間で異なる可能性がある。例として、エチレン受容体阻害剤である 1-メチルシクロプロペン (1-MCP) がリンゴ果実の *MdETR1*、*MdERS1* および *MdCTR1* の遺伝子発現を抑制した一方で、モモ果実の *PpETR1*、*PpERS1* および *PpCTR1* の遺伝子発現には影響しなかった (Dal Cin et al., 2006)。本研究では、NDGA 処理がウメ果実の *PmETR1*、*PmERS1* および *PmCTR1* の遺伝子発現に影響を及ぼした。ウメ果実のエチレン受容体およびシグナル伝達遺伝子の NDGA 処理に対する反応が前述のチェリートマト果実に比べて感受的であるのかもしれない。本研究において、温水処理により処理 3 日後の内生 ABA 濃度は NDGA 処理と同様に減少したにもかかわらず、温水処理 1 日後の内生 ABA 濃度は増加し、*PmPP2C37-like* 遺伝子発現は抑制されていた。ABA は環境ストレス耐性に関与する植物ホルモンとして位置づけられている (Sah et al., 2016)。これまでに、高温ストレスに対する ABA の役割に関する報告が行われている。例えば、アシおよびブドウに高温処理を行ったところ、一時的に内生 ABA 含量が増加し、高温耐性が向上した (Ding et al., 2010; Wang et al., 2005)。また、トウモロコシおよびクリーピングベントグラスに外生 ABA 処理を行ったところ、高温耐性の向上が認められた (Gong et al., 1998; Larkindale and Huang, 2005)。さらに、タバコにおいて、高温処理により ABA シグナル伝達を負に制御する *NtPP2C1* の遺伝子発現が速やかに減少した (Vranová et al., 2000)。すなわち、本研究で認められた温水処理による一時的な ABA 濃度の上昇は、高温ストレスに対する反応であると推察された。また、温水+NDGA 処理区における処理 3 日後の内生 ABA 濃度はすべての処理区の中で最も低く、*PmPP2C37-like* 遺伝子の発現は最も高くなった。これらの結果は、温水処理と NDGA 処理の併用処理が ABA 合成およびシグナル伝達を阻害するのに効果的であることを示唆している。

3.5 結論

本研究において、温水処理（40°C, 5分）と 100 μM NDGA 処理（22°C, 5分）の併用処理はエチレン関連遺伝子（*PmACSI*, *PmACO1*, *PmETR1*, *PmERS1* および *PmCTR1*）および ABA 関連遺伝子（*PmNCED1* および *PmPP2C37-like*）の遺伝子発現を制御することで、収穫後のウメ‘稲積’果実のエチレン産生量および内生 ABA 濃度を抑制した。その結果、果皮中のクロロフィル分解や果皮色の黄化、果肉の軟化を遅延させた（Fig. 3.7）。これらの結果は、収穫後の高温ストレス処理と ABA 合成阻害剤処理の併用処理がウメ果実の日持ち性向上に効果的な方法であることを示唆している。

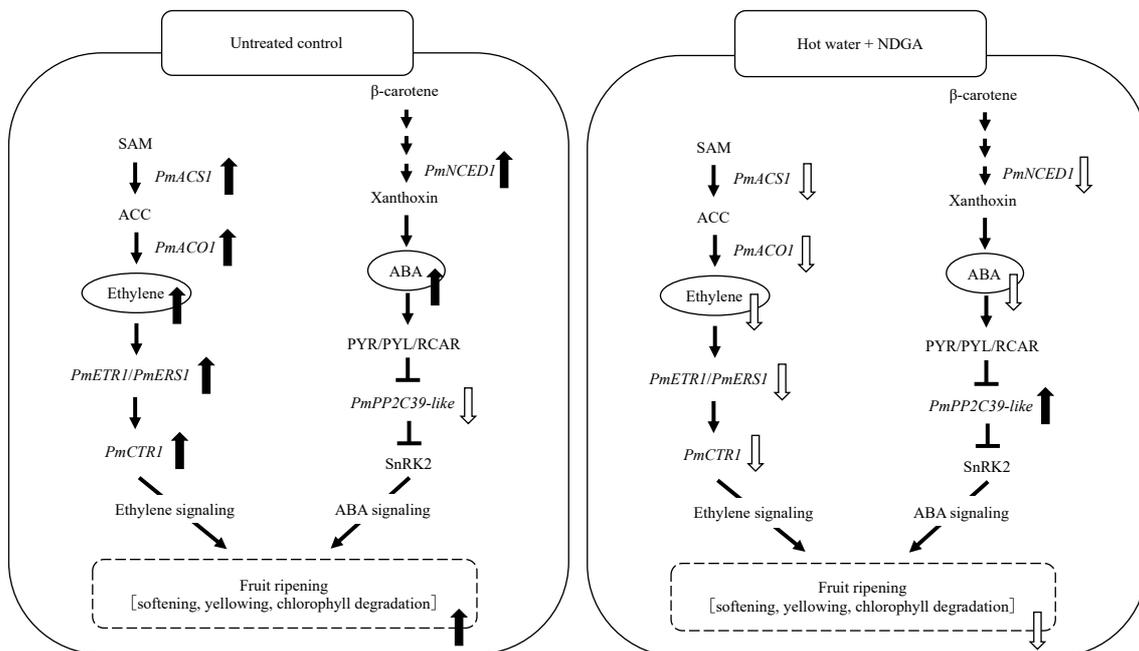


Fig. 3.7 Schematic diagram of the regulation of fruit ripening by combination treatment of hot water + NDGA. Dark arrows indicate upregulation. Blank arrows indicate downregulation.

第4章 総括

4.1 本論文の摘要

内生 ABA 制御による環境ストレス応答への影響を明らかにすることを目的に、はじめに「ABA8'位水酸化酵素阻害剤処理がブドウ挿し木の乾燥ストレス耐性および発根に及ぼす影響」について検討した。ブドウ‘巨峰’挿し木に ABA8'位水酸化酵素阻害剤 Abz-E3M を葉面散布した後、乾燥ストレス処理を行った。その結果、葉中の ABA 代謝物濃度の減少に伴い、内生 ABA 濃度が増加し、乾燥ストレス耐性向上が認められた。また、Abz-E3M 処理は挿し穂葉中および基部中の内生 IAA 濃度を増加させ、不定根発根に関与する遺伝子 *VvARF6*、*VvARF8* および *VvARF17* の遺伝子発現を制御することで発根率を上昇させた。このことから、乾燥ストレス下のブドウ挿し木において ABA8'位水酸化酵素阻害剤処理は乾燥ストレス耐性の向上および発根率の向上に効果的な方法であると推察された。次に「収穫後の高温ストレス処理+ABA 合成阻害剤処理がウメ果実の追熟に及ぼす影響」について検討した。緑熟期に収穫したウメ‘稻積’果実に温水+NDGA 処理を行った結果、果皮色の黄化が遅延し、果肉硬度が高くなった。また、温水+NDGA 処理によりエチレン産生量が減少し、エチレン関連遺伝子 *PmACSI*、*PmACOI*、*PmETRI*、*PmERSI* および *PmCTR1* の発現が抑制されていた。さらに、内生 ABA 濃度および ABA 合成関連遺伝子 *PmNCEDI* 発現が抑制されており、ABA シグナル抑制遺伝子 *PmPP2C37-like* の発現は高まった。以上の結果は、高温ストレス処理+ABA 合成阻害剤処理が、ウメ果実の追熟遅延に効果的な方法であると推察された。以上より、環境ストレス下での内生 ABA 制御は植物の環境ストレス応答に影響し、より好ましいストレス応答へと制御できると考えられた。

4.2 今後の課題および展望

環境ストレスは作物生産に悪影響を及ぼす重要な要因である (Ashraf et al., 2012)。一方で、適度な環境ストレス処理は収穫後の果実の貯蔵性向上や品質維持に効果的である (Opio et al., 2017; Francini and Sebastiani, 2019)。ABA は植物の環境ストレス応答に関与する植物ホルモンであり、内生 ABA 量の制御は植物の環境ストレス応答をより好ましいストレス応答へと制御できる可能性がある。そこで本研究では、ABA 不活性化阻害剤による乾燥ストレス下での ABA 内生量の増強および ABA 合成阻害剤による高温ストレス下での ABA 内生量の抑制について試みた。

第 2 章において、乾燥ストレス下におけるブドウ挿し木への ABA8'位水酸化酵素阻害剤処理による内生 ABA 濃度の増加、プロリン濃度および抗酸化活性の低下ならびに葉の水ポテンシャルを高く維持した本結果は、既往のリンゴ実生を供試した研究 (Kondo et al., 2012; Sales et al., 2017) と同様の結果となり、ブドウ挿し木においても乾燥ストレス耐性の向上が確認されたと言える。ブドウ挿し木は発根の有無が繁殖の成否を決定する要因であることから (Shiozaki et al., 2013)、本研究では挿し穂地上部への乾燥ストレス耐性付与が発根に及ぼす影響について注目した。その結果、乾燥ストレス耐性が向上した挿し穂において、発根率の増加が認められた。ブドウ挿し木の発根には内生 IAA が関与している (Kawai, 1996)。そこで発根率増加の要因を探るために、挿し穂葉中および基部中の内生 IAA 濃度を測定したところ、両部位における内生 IAA 濃度は ABA8'位水酸化酵素阻害剤処理区で増加していた。乾燥ストレスは葉の内生 ABA だけでなく IAA も増加させるとの知見があることから (Mahouachi et al., 2014; Zhang et al., 2015; Li et al., 2016)、ABA の不活性化阻害による内生 ABA の増加が内生 IAA の蓄積にも関与していると推察されたが、ABA8'位水酸化酵素阻害剤そのものによる IAA 合成への影響は未検討であるため、今後さらなる研

究が必要であると考え。不定根形成とオーキシシグナル関連遺伝子については、シロイヌナズナを供試した研究から、ARF6 および ARF8 が正の調節因子として、ARF17 が負の調節因子として働くことが報告されている (Gutierrez et al., 2009)。本研究においても、*VvARF6*、*VvARF8* および *VvARF17* の 3 つの ARF 遺伝子について発現解析を行ったところ、シロイヌナズナと同様に *VvARF6* および *VvARF8* が発根に対してポジティブレギュレーターとして作用し、*VvARF17* がネガティブレギュレーターとして作用していた。ARF のリプレッサーとして機能する AUX/IAA やオーキシン応答性遺伝子についても検討することで、乾燥ストレス耐性付与による不定根発根への影響がより詳細に明らかになるとと思われる。

第 3 章において、収穫後の日持ち性が極めて悪いことが経験的に知られているウメ果実は、本研究においても、貯蔵開始 3 日後には果肉の軟化と果皮色の黄化が認められた。ウメは低温貯蔵に適さないこと (Imahori et al., 2008; Endo et al., 2019) や、1-MCP の効果が低いこと (Poyesh et al., 2017) から、日持ち性向上のための方法が求められている。高温ストレス処理は果実のエチレン合成を阻害するが、一方で、高温ストレス耐性のために内生 ABA を増加させる (Teplova et al., 2000; Abass and Rajashekar, 1993)。既往の研究から、ウメ果実の追熟にはエチレンに加え、内生 ABA の関与も示唆されている (Wang et al., 2019) ことから、ウメ果実の日持ち性向上にはエチレンおよび ABA 両方の合成阻害が重要であると考えた。そこで本研究では、高温ストレス処理として用いた温水浸漬処理と ABA 合成阻害剤 NDGA 処理の併用処理について検討した。高温ストレス処理はエチレン産生の抑制だけでなく、外生エチレン処理の効果も阻害することから、高温ストレス処理がエチレン受容体にも作用すると考えられてきた (Lurie, 1998)。本研究では、温水処理がエチレン合成系遺伝子に加え、エチレン受容体およびシグナル関連遺伝子の発現も抑制することを見

出した。また、温水処理 1 日後の果実で内生 ABA の増加が認められた。前述のように、植物は高温ストレス耐性のために一時的に内生 ABA を増加させることが報告されており (Ding et al., 2010; Wang et al., 2005)、本研究における温水処理による内生 ABA の増加は高温ストレス耐性のための一時的な増加であったと考えられた。一方で、温水+NDGA 処理はエチレンおよび ABA 両方の合成を阻害していたことから、仮説通り、併用処理によりウメ果実の追熟抑制効果は温水処理あるいは NDGA 処理の単用処理よりも効果的であった。しかし、温水+NDGA 処理でも果肉の軟化が速やかに進行したことや、処理 6 日後には果皮色の黄化も開始したことから、実用化のためには追熟抑制効果の向上および貯蔵性向上が課題である。

植物は常に環境ストレスに曝されている。環境ストレス応答を理解し、制御することは作物生産にとってこれからも欠かせない課題の一つである。本研究で得られた結果が、植物が環境ストレスと上手に付き合うための一助になることを期待したい。

引用文献

- Abass M, Rajashekar CB (1993) Abscisic acid accumulation in leaves and cultured cells during heat acclimation in grapes. *HortScience* 28:50–52.
- Ahkami AH, Melzer M, Ghaffari MR, Pollmann S, Javid MG, Shahinnia F, Hajirezaei MR, Druege U (2013) Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta* 238:499–517.
- Ashraf M, Öztürk M, Ahmad MSA, Aksoy A (2012) Crop production for agricultural improvement (Springer).
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205–207.
- Blythe EK, Sibley JL, Tilt KM, Ruter JM (2003) Foliar application of auxin for rooting stem cuttings of selected ornamental crops. *Journal of Environmental Horticulture* 21:131–136.
- Boneh U, Biton I, Zheng C, Schwartz A, Ben-Ari G (2012) Characterization of potential ABA receptors in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Reports* 31:311–321.
- Creelman RA, Bell E, Mullet JE (1992) Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 99:1258–1260.
- Cruz de Carvalho MH (2008) Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signal & Behavior* 3:156–165.
- Dal Cin V, Rizzini FM, Botton A, Tonutti P (2006) The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit. *Postharvest Biology and Technology* 42:125–133.
- Ding W, Song L, Wang X, Bi Y (2010) Effect of abscisic acid on heat stress tolerance in

- the calli from two ecotypes of *Phragmites communis*. *Biologia Plantarum* 54:607–613.
- Du H, Wu N, Chang Y, Li X, Xiao J, Xiong L (2013) Carotenoid deficiency impairs ABA and IAA biosynthesis and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 83:475–488.
- El-Sharkawy I, Kim WS, El-Kereamy A, Jayasankar S, Svircev AM, Brown DCW (2007) Isolation and characterization of four ethylene signal transduction elements in plums (*Prunus salicina* L.). *Journal of Experimental Botany* 58:3631–3643.
- Endo H, Ose K, Bai J, Imahori Y (2019) Effect of hot water treatment on chilling injury incidence and antioxidative responses of mature green mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. *Scientia Horticulturae* 246:550–556.
- Francini A, Sebastiani L (2019) Abiotic stress effects on performance of horticultural crops. *Horticulturae* 5:67.
- García-Gómez ML, Sánchez-Romero C, Barceló-Munoz A, Heredia A, Pliego-Alfaro F (1994) Levels of endogenous indole-3-acetic acid and indole-3-acetyl-aspartic acid during adventitious rooting in avocado microcuttings. *Journal of Experimental Botany* 45:865–870.
- Gong M, Li YJ, Chen SZ (1998) Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. *Journal of Plant Physiology* 153:488–496.
- González-Agüero M, García-Rojas M, Di Genova A, Correa J, Maass A, Orellana A, Hinrichsen P (2013) Identification of two putative reference genes from grapevine suitable for gene expression analysis in berry and related tissues derived from RNA-Seq data. *BMC Genomics* 14:878
- Guan L, Murphy AS, Peer WA, Gan L, Li Y, Cheng ZM (2015) Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. *Critical Reviews in Plant Sciences*

34:506–521.

- Gutierrez L, Bussell JD, Păcurar DI, Schwambach J, Păcurar M, Bellini C (2009) Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *The Plant Cell* 21:3119–3132.
- Hagen G and Guilfoyle T (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology* 49:373–385.
- Han SY, Kitahata N, Sekimata K, Saito T, Kobayashi M, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Yoshida S, Asami T (2004) A novel inhibitor of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in abscisic acid biosynthesis in higher plants. *Plant Physiology* 135:1574–1582.
- Hayama H, Ito A, Kashimura Y (2005) Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment under sub-atmospheric pressure on the softening of ‘Akatsuki’ peach. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 74:398–400.
- Henderson DC and Hammond J (2013) CKC: Isolation of nucleic acids from a diversity of plants using CTAB and silica columns. *Molecular Biotechnology* 53:109–117.
- Ikegami K, Okamoto M, Seo M, Koshiha T (2009) Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *Journal of Plant Research* 122:235–243.
- Imahori Y, Takemura M, Bai J (2008) Chilling-induced oxidative stress and antioxidant response in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology* 49:54–60.
- Jia HF, Chai YM, Li CL, Lu D, Luo JJ, Qin L, Shen YY (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology* 157:188–199.

- Jia H, Wang S, Lin H, Saito T, Kongsuwan A, Todoroki Y, Kondo S (2017) Effects of abscisic acid agonist or antagonist applications on aroma volatiles and anthocyanin biosynthesis in grape berries. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 93:392–399.
- Jitratham A, Yazama F, Kondo S (2006) Effects of drought stress on abscisic acid and jasmonate metabolism in citrus. *Environmental Control in Biology* 44:41–49.
- Ju C, Chang C (2015) Mechanistic insights in ethylene perception and signal transduction. *Plant Physiology* 169:85–95.
- Kaewsuksaeng S, Tatmala N, Srilaong V, Pongprasert N (2015) Postharvest heat treatment delays chlorophyll degradation and maintains quality in Thai lime (*Citrus aurantifolia* Swingle cv. Paan) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 100:1–7.
- Kaewsuksaeng S, Nomura M, Shigyo M, Yamauchi N (2019) Suppression of chlorophyll breakdown and quality changes by hot water treatment of ‘Pichit 1’ lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) fruit. *The Horticulture Journal* 88:541–547.
- Kamboj JS, Browning G, Blake PS, Quinlan JD, Baker DA (1999) GC-MS-SIM analysis of abscisic acid and indole-3-acetic acid in shoot bark of apple rootstocks. *Plant Growth Regulation* 28:21–27.
- Kawai Y (1996) Changes in endogenous IAA during rooting of hardwood cuttings of grape, ‘Muscat Bailey A’ with and without a bud. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 65:33–39.
- Kelen M and Ozkan G (2003) Relationships between rooting ability and changes of endogenous IAA and ABA during the rooting of hardwood cuttings of some grapevine rootstocks. *European Journal of Horticultural Science* 68:8–13.
- Ketsa S, Chidtragool S, Klein JD, Lurie S (1999) Ethylene synthesis in mango fruit following heat treatment. *Postharvest Biology and Technology* 15:65–72.

- Kondo S, Sugaya S, Sugawa S, Ninomiya M, Kittikorn M, Okawa K, Ohara H, Ueno K, Todoroki Y, Mizutani M, Hirai N (2012) Dehydration tolerance in apple seedlings is affected by an inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A. *Journal of Plant Physiology* 169:234–241.
- Kondo S, Tomiyama H, Rodyoung A, Okawa K, Ohara H, Sugaya S, Terahara N, Hirai N (2014) Abscisic acid metabolism and anthocyanin synthesis in grape skin are affected by light emitting diode (LED) irradiation at night. *Journal of Plant Physiology* 171:823–829.
- Kowitcharoen L, Wongs-Aree C, Setha S, Komkhuntod R, Srilaong V, Kondo S (2015) Changes in abscisic acid and antioxidant activity in sugar apples under drought conditions. *Scientia Horticulturae* 193:1–6.
- Kowitcharoen L, Wongs-Aree C, Setha S, Komkhuntod R, Kondo S, Srilaong V (2018) Pre-harvest drought stress treatment improves antioxidant activity and sugar accumulation of sugar apple at harvest and during storage. *Agriculture and Natural Resources* 52:146–154.
- Krzywinska E, Kulik A, Bucholc M, Fernandez MA, Rodriguez PL, Dobrowolska G (2016) Protein phosphatase type 2C PP2CA together with ABI1 inhibits SnRK2.4 activity and regulates plant responses to salinity. *Plant Signaling & Behavior* 11:e1253647.
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E (2004) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO Journal* 23:1647–1656.
- Lambers H, Chapin III FS, Pons TL (2008) *Plant Physiological Ecology*.
- Larkindale J, Huang B (2005) Effects of abscisic acid, salicylic acid, ethylene and

- hydrogen peroxide in thermotolerance and recovery for creeping bentgrass. *Plant Growth Regulation* 47:17–28.
- Li C, Nong Q, Solanki MK, Liang Q, Xie J, Liu X, Li Y, Wang W, Yang L, Li Y (2016) Differential expression profiles and pathways of genes in sugarcane leaf at elongation stage in response to drought stress. *Scientific Reports* 6:25698.
- Li R, Mock R, Huang Q, Abad J, Hartung J, Kinard G (2008) A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods* 154:48–55.
- Li SB, OuYang WZ, Hou XJ, Xie LL, Hu CG, Zhang JZ (2015) Genome-wide identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Frontiers in Plant Science* 6:119.
- Lin H, Wang S, Saito T, Ohkawa K, Ohara H, Kongsuwan A, Jia H, Guo Y, Tomiyama H, Kondo S (2018) Effects of IPT or NDGA application on ABA metabolism and maturation in grape berries. *Journal of Plant Growth Regulation* 37:1210–1221.
- Liscun E and Reed JW (2002) Genetics of AUX/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology* 49:387–400.
- Luo XC, Sun MH, Xu RR, Shu HR, Wang JW, Zhang SZ (2014) Genome-wide identification and expression analysis of the ARF gene family in apple. *Journal of Genetics* 93:785–797.
- Luo Z, Zhang L, Xu T, Xie J, Xi Y (2010) Effect of hot-air treatment on the ripening of ‘Qingnai’ plum (*Prunus salicina* Lindl.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 85:12–16.
- Lurie S, Handros A, Fallik E, Shapira R (1996) Reversible inhibition of tomato fruit gene expression at high temperature. *Plant Physiology* 110:1207–1214.
- Lurie S (1998) Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 14:257–

269.

- Mahouachi J, Argamasilla R, Gómez-Cadenas A (2012) Influence of exogenous glycine betaine and abscisic acid on papaya in responses to water-deficit stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 31:1–10.
- Mahouachi J, López-Climent MF, Gómez-Cadenas A (2014) Hormonal and hydroxycinnamic acids profiles in banana leaves in response to various periods of water stress. *The Scientific World Journal* vol2014, p9.
- McLellan MR, Lind LR, Kime RW (1995) Hue angle determinations and statistical analysis for multiquadrant Hunter L, a, b data. *Journal of Food Quality* 18:235–240.
- Meng JF, Xu TF, Wang ZZ, Fang YL, Xi ZM, Zhang ZW (2014) The ameliorative effects of exogenous melatonin on grape cuttings under water-deficient stress: antioxidant metabolites, leaf anatomy, and chloroplast morphology. *Journal of Pineal Research* 57:200–212.
- Min Z, Li R, Chen L, Zhang Y, Li Z, Liu M, Ju Y, Fang Y (2019) Alleviation of drought stress in grapevine by foliar-applied strigolactones. *Plant Physiology and Biochemistry* 135:99–110.
- Mou W, Li D, Bu J, Jiang Y, Khan ZU, Luo Z (2016) Comprehensive analysis of ABA effects on ethylene biosynthesis and signaling during tomato fruit ripening. *PLOS ONE* 11:e0154072.
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56:165–185.
- Nimitkeatkai H, Shishido M, Okawa K, Ohara H, Ban Y, Kita M, Moriguchi T, Ikeura H, Hayata Y, Kondo S (2011) Effect of jasmonates on ethylene biosynthesis and aroma volatile emission in Japanese apricot infected by a pathogen (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Journal of Agricultural Food Chemistry* 59:6423–6429.

- Nishimura N, Tsuchiya W, Hirayama T, Yamazaki T (2019) New mechanism of abscisic acid signaling cascade: survival strategy for plants to adapt to growing environmental change. *Kagaku to Seibutsu* 57:736–742.
- Nordstrom AC, Jacobs FA, Eliasson L (1991) Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiology* 96:856–861.
- Ogura Y, Ishihara A, Iwamura H (2001) Induction of hydroxycinnamic acid amides and tryptophan by jasmonic acid, abscisic acid and osmotic stress in barley leaves. *Zeitschrift für Naturforschung C* 56:193–202.
- Okamoto M, Kushiro T, Jikumaru Y, Abrams SR, Kamiya Y, Seki M, Nambara E (2011) ABA 9'-hydroxylation is catalyzed by CYP707A in Arabidopsis. *Phytochemistry* 72:717–722.
- Okazaki M, Kittikorn M, Ueno K, Mizutani M, Hirai N, Kondo S, Ohnishi T, Todoroki Y (2012) Abscinazole-E2B, a practical and selective inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20:3162–3172.
- Okazaki M, Nimitkeatkai H, Muramatsu T, Aoyama H, Ueno K, Mizutani M, Hirai N, Kondo S, Ohnishi T, Todoroki Y (2011) Abscinazole-E1, a novel chemical tool for exploring the role of ABA 8'-hydroxylase CYP707A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19:406–413.
- Opio P, Jitareerat P, Pongprasert N, Wongs-Aree C, Suzuki Y, Srilaong V (2017) Efficacy of hot water immersion on lime (*Citrus aurantifolia*, Swingle cv. Paan) fruit packed with ethanol vapor in delaying chlorophyll catabolism. *Scientia Horticulturae* 224:258–264.
- Pacurar DI, Perrone I, Bellini C (2014) Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia Plantarum* 151:83-96.

- Paull RE, Chen NJ (2000) Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest biology and Technology* 21:21–37.
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975:384–394.
- Poyesh DS, Terada N, Sanada A, Gemma H, Koshio K (2017) Effect of 1-MCP on ethylene regulation and quality of apple, apricot and asparagus. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 23:90–102.
- Ren H, Hu H, Luo X, Zhang C, Li X, Li P, Li W, Khawar A, Sun X, Ren Z, Shen C (2019) Dynamic changes of phytohormone signaling in the base of *Taxus media* stem cuttings during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae* 246:338–346.
- Sah SK, Reddy KR, Li J (2016) Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in Plant Science* 7:571.
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M (2004) Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology* 134:1439–1449.
- Salazar-Parra C, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Morales F (2012) Climate change (elevated CO₂, elevated temperature and moderate drought) triggers the antioxidant enzymes' response of grapevine cv. Tempranillo, avoiding oxidative damage. *Physiologia Plantarum* 144:99–110.
- Sales L, Ohara H, Ohkawa K, Saito T, Todoroki Y, Srilaong V, Kondo S (2017) Salt tolerance in apple seedlings is affected by an inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A. *Journal of Plant Growth Regulation* 36:645–650.
- Schultz HR (2003) Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and

- anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant, Cell & Environment* 26:1393–1405.
- Setha S, Kondo S, Hirai N, Ohigashi H (2004) Xanthoxin, abscisic acid and its metabolite levels associated with apple fruit development. *Plant Science* 166:493–499.
- Shiozaki S, Makibuchi M, Ogata T (2013) Indole-3-acetic acid, polyamines, and phenols in hardwood cuttings of recalcitrant-to-root wild grapes native to east asia: *Vitis davidii* and *Vitis kiusiana*. *Journal of Botany* vol2013, p9.
- Sorin C, Bussell JD, Camus I, Ljung K, Kowalczyk M, Geiss G, McKhann H, Garcion C, Vaucheret H, Sandberg G, Bellini C (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *The Plant Cell* 17:1343–1359.
- Štefančič M, Štampar F, Veberič R, Osterc G (2007) The levels of IAA, IAAsp and some phenolics in cherry rootstock ‘GiSela 5’ leafy cuttings pretreated with IAA and IBA. *Scientia Horticulturae* 112:399–405.
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* 319:1384–1386.
- Takeuchi J, Okamoto M, Mega R, Kanno Y, Ohnishi T, Seo M, Todoroki Y (2016) Abscinazole-E3M, a practical inhibitor of abscisic acid 8'-hydroxylase for improving drought tolerance. *Scientific Reports* 6 p37060.
- Taylor BD and Hoover BK (2018) Foliar auxin application improves adventitious rooting of wall germander cuttings. *HortTechnology* 28:17–21.
- Teplova IR, Farkhutdinov RG, Mitrichenko AN, Ivanov II, Veselov SY, Valcke RL, Kudoyarova GR (2000) Response of tobacco plants transformed with the *ipt* gene to elevated temperature. *Russian Journal of Plant Physiology* 47:416–419.
- Tiwari SB, Wang XJ, Hagen G, Guilfoyle TJ (2001) AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and active are modulated by auxin. *The Plant Cell*

13:2809–2822.

Todoroki Y, Aoyama H, Hiramatsu S, Shirakura M, Nimitkeatkai H, Kondo S, Ueno K, Mizutani M, Hirai N (2009a) Enlarged analogues of uniconazole, new containing inhibitors of ABA 8'-hydroxylase CYP707A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19:5782–5786.

Todoroki Y, Kobayashi K, Shirakura M, Aoyama H, Takatori K, Nimitkeatkai H, Jin MH, Hiramatsu S, Ueno K, Kondo S, Mizutani M, Hirai N (2009b) Abscinazole-F1, a conformationally restricted analogue of the plant growth retardant uniconazole and an inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A with no growth-retardant effect. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:6620–6630.

Todoroki Y, Naiki K, Aoyama H, Shirakura M, Ueno K, Mizutani M, Hirai N (2010) Selectivity improvement of an azole inhibitor of CYP707A by replacing the monosubstituted azole with a disubstituted azole. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20:5506–5509.

Todoroki Y (2016) Studies on creation of specific regulators for abscisic acid catabolism and signal transduction. *Regulation of Plant Growth & Development* 51:1–7.

Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5844–5849.

Ullah A, Manghwar H, Shaban M, Khan AH, Akbar A, Ali U, Ali E, Fahad S (2018) Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. *Environmental Science and Pollution Research* 25:33103–33118.

Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of*

- National Academy of Sciences of the United States of America 106:17588–17593.
- Vranová E, Langebartels C, Montagu MV, Inzé D, Camp WV (2000) Oxidative stress, heat shock and drought differentially affect expression of a tobacco protein phosphatase 2C. *Journal of Experimental Botany* 51:1763–1764.
- Wan S, Li W, Zhu Y, Liu Z, Huang W, Zhan J (2014) Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the auxin response factor gene family in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Reports* 33:1365–1375.
- Wang LJ, Huang WD, Liu YP, Zhan JC (2005) Changes in salicylic and abscisic acid contents during heat treatment and their effect on thermotolerance of grape plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 52:516–520.
- Wang R, Estelle M (2014) Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology* 21:51–58.
- Wang S, Lin H, Saito T, Ohkawa K, Ohara H, Jia HF, Kondo S (2019) Abscisic acid affects ethylene metabolism and carotenoid biosynthesis in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *Agri Gene* 12:100083.
- Wang T, Hao R, Pan H, Cheng T, Zhang Q (2014) Selection of suitable reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Prunus mume* during flowering stages and under different abiotic stress conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 139:113–122.
- Wheeler S, Loveys B, Ford C, Davies C (2009) The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15:195–204.
- Wilmoth JC, Wang S, Tiwari SB, Joshi AD, Hagen G, Guilfoyle TJ, Alonso JM, Ecker JR, Reed JW (2005) NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-

- induced lateral root formation. *Plant Journal* 43:118–130.
- Wu B, Guo Q, Wang GX, Peng XY, Wang JD, Che FB (2015) Effects of different postharvest treatments on the physiology and quality of ‘Xiaobai’ apricots at room temperature. *Journal of Food Science and Technology* 52:2247–2255.
- Xie Q, Essemine J, Pang X, Chen H, Cai W (2020) Exogenous application of abscisic acid to shoots promotes primary root cell division and elongation. *Plant Science* 292:110385.
- Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1997) Regulation of leaves of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and Cell Physiology* 38:1095–1102.
- Zaharah SS, Singh Z (2012) Abscisic acid modulates mango fruit ripening. *Acta Horticulturae* 934:913–919.
- Zhang C, Huang Z (2013) Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress. *Scientia Horticulturae* 159:172–177.
- Zhang S, Chachin K, Iwata T (1991) Effects of polyethylene packaging and ethylene absorbent on storage of mature-green mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) fruits at ambient temperature. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 60:183–190.
- Zhang X, Ervin EH, Liu Y, Hu G, Shang C, Fukao T, Alpuerto J (2015) Differential responses of antioxidants, abscisic acid, and auxin to deficit irrigation in two perennial ryegrass cultivars contrasting in drought tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 140:562–572.
- Zhang Y, Wang X, Luo Y, Zhang L, Yao Y, Han L, Chen Z, Wang L, Li Y (2019) OsABA8ox2, an ABA catabolic gene, suppresses root elongation of rice seedlings and

contributes to drought response. *The Crop Journal* 8:480–491.

謝辞

本論文を作成するにあたり研究指導をして頂きました近藤悟教授に感謝の意を表します。また、本論文の審査をして頂きました小原均教授、丸尾達教授、宍戸雅宏教授に心より御礼申し上げます。

本研究科の大川克哉講師には学部時代から果樹の栽培や研究に対して多くの助言を頂きました。さらに、静岡大学の轟泰司教授にはアブシナゾール E3M を、京都大学の平井信博教授にはファゼイン酸およびジヒドロファゼイン酸の内部標準をご譲渡頂きました。先生方に改めて心より御礼申し上げます。

また、充実した研究生活を送れたのは、果樹園芸学研究室の同級生および後輩たちのおかげです。ここに感謝申し上げます。

最後に、会社を退職し博士後期課程に進学することを快く受け入れ応援してくれた両親、姉、弟、そして妻に心より感謝いたします。本当にありがとうございました。